

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**E.A.P. DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA**

**“ESTUDIO GENÉTICO MOLECULAR DE *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* RESISTENTES A VANCOMICINA AISLADAS EN EL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN RED ESSALUD – LIMA, PERÚ”**

**TESIS**

**Para optar al Título Profesional de  
Biólogo Microbiólogo y Parasitólogo**

**AUTOR**

**Krystell Melina Rosas Fretel**

**ASESOR**

**Débora Alvarado Iparraguirre**

**Lima – Perú**

**2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**ESTUDIO GENÉTICO MOLECULAR DE *Enterococcus  
faecalis* y *Enterococcus faecium* RESISTENTES A  
VANCOMICINA AISLADAS EN EL HOSPITAL NACIONAL  
GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN RED ESSALUD –  
LIMA, PERÚ**

**Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo  
y Parasitólogo**

**Bach. KRYSTELL MELINA ROSAS FRETTEL  
Asesor: Mg. DÉBORA ALVARADO IPARRAGUIRRE**

**Lima – Perú**

**2014**

*Dedicado a la sonrisa que veo todas las mañanas al despertar, a ese hermoso ser que nació de nuestra unión, a ti Facundo y a Carlos por tanto amor y comprensión. Y a todas las personas que colaboraron de alguna manera familia, amigos, profesores.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A continuación esto es una mención a los que me dieron la oportunidad de poder realizar esta tesis, a los que me brindaron su apoyo, tanto espiritual, técnica, didáctica y a todos los que con su ejemplo y su palabra de aliento hicieron posible este trabajo.

Mi agradecimiento a mi asesora de tesis, la Mg. Débora Alvarado Iparraguirre, por su infinita paciencia, por su constancia férrea apoyándome a seguir y culminar esta tesis.

Seguidamente quiero agradecer el apoyo económico brindado por el Proyecto Multidisciplinario VRI-UNMSM, 2011- PM12011F02 y al Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado 2012 financiado por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, los cuales facilitaron el desarrollo y la culminación de mi tesis de pregrado.

Agradezco también al Dr. Rafael Ramírez Ponce quién me brindó la oportunidad de practicar en el Servicio de Microbiología el cual está a su cargo, quién no dudó en darme la oportunidad de plantear esta problemática para mi tesis.

También agradecer al Blgo. Hugo Marcial Jove Químper, quién fue un guía al iniciar esta tesis y con su ejemplo de empeño fueron los inicios para emprender este trabajo.

A todo el personal que labora en el Departamento de Patología Clínica, Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen – RED ESSALUD por las enseñanzas, consejos y aliento brindado. Al Dr. Wilfredo Flores Paredes por sus consejos y ayuda brindada.

Al grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la UNMSM por el apoyo, compañía y fraternidad. A los profesores Mg. Ruth García De La Guarda, Dr. Pablo Ramírez Roca por el espacio y consejos brindados, al Blgo. Abraham Espinoza Culupú, Blgo. Carlos Tello Ayllón, Blgo. Fernando De La Cruz Calvo, Blgo Hamilton Chen Bueno Mendizábal por compartir sus conocimientos y experiencias en el campo de la biología molecular, las cuales me fueron muy útiles y necesarias para la elaboración de este trabajo. A Joe Hermosilla Jara, Ivette Alejandra Fuentes Quispe por haber ayudado en este trabajo cuando más lo necesité.

A mis amigos de siempre, Cledy, Yanina, Evony, Yisella, Pablo, Oscar, Mayer, Janet, Julio, Eddy, Jane, Joselito, Ilario, Manuel. También agradecer a mis amigas y compañeras Geraldine y Aída, con las que compartimos momentos sin iguales.

Y al final, pero no menos importante, a mi familia, a mis padres Andrés y Dina, a mis hermanos, a Valentina, por apoyarme hasta el final y muchas veces acompañarme en las largas noches, brindándome su presencia, tendiéndome la mano, por su apoyo infinito así como su paciencia y comprensión.

A mis amores, Carlos por qué es mi compañero eterno y mi apoyo incondicional, y a mi hijo Facundo Salvador por ser mi principio y fin, mi motivo de todo.

## ÍNDICE

	Pag.
ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Enterococcus</i> .....	4
2.1.1. Identificación .....	5
2.2. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS .....	6
2.3. RESISTENCIA A GLUCOPÉPTIDOS .....	9
2.3.1. Mecanismo de acción de la vancomicina y resistencia.....	12
2.3.2. GENOTIPOS DE RESISTENCIA .....	14
2.3.2.1. Fenotipo VanA .....	15
2.3.2.2. Fenotipo VanB .....	17
2.3.2.3. Fenotipos VanC, VanD, VanE y VanG .....	18
2.3.3. Heterorresistencia .....	22
2.4. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA .....	22
2.5. DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES <i>van</i> .....	23
2.6. EPIDEMIOLOGÍA.....	25
III. OBJETIVOS .....	28
3.1. Objetivo General .....	28
3.2. Objetivos específicos .....	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
4.1. Material biológico .....	30
4.2. Aislamiento, selección e identificación de las cepas de <i>Enterococcus</i> .....	31
4.2.1. Conservación de cepas.....	32
4.3. Determinación del nivel de resistencia a vancomicina.....	33
4.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	33
4.4. Determinación de la naturaleza genética de la resistencia .....	34
4.4.1. Curación de plásmidos.....	34
4.4.2. Conjugación .....	36

4.5.	Identificación de los genes de resistencia a Vancomicina .....	37
4.5.1.	Extracción ADN genómico .....	37
4.5.2.	Extracción de ADN plasmídico .....	38
4.5.3.	PCR <i>multiplex</i> para genes de resistencia.....	38
V.	RESULTADOS.....	41
5.1.	Aislamiento, selección e identificación de cepas .....	41
5.2.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante la prueba de E-test.....	46
5.3.	Curación de plásmidos.....	53
5.4.	Conjugación .....	56
5.5.	Identificación de los genes de resistencia .....	59
VI.	DISCUSIÓN .....	61
VII.	CONCLUSIONES .....	69
VIII.	RECOMENDACIONES .....	70
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## i. ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
<b>Tabla 1.</b> Grupos y especies de <i>Enterococcus</i> spp.....	6
<b>Tabla 2.</b> Resistencias intrínsecas y adquiridas en <i>Enterococcus</i> .....	7
<b>Tabla 3.</b> Puntos de corte para <i>Enterococcus</i> sp.....	8
<b>Tabla 4.</b> Actividad antibacteriana de los Glucopéptidos.....	11
<b>Tabla 5.</b> Genotipos de resistencia a vancomicina en enterococos.....	15
<b>Tabla 6.</b> Cepas utilizadas en el estudio.....	30
<b>Tabla 7.</b> Muestras procesadas en los servicios del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen .....	31
<b>Tabla 8.</b> Concentraciones de SDS para la curación de plásmidos.....	35
<b>Tabla 9.</b> <i>Primers</i> para identificación de especie de <i>Enterococcus</i> .....	39
<b>Tabla 10.</b> <i>Primers</i> específicos para los genes de resistencia a vancomicina en <i>Enterococcus</i> .....	39
<b>Tabla 11.</b> Datos acumulados de las pruebas realizadas.....	47
<b>Tabla 12.</b> Ubicación de la resistencia a vancomicina en <i>Enterococcus</i> después de la curación con SDS.....	54
<b>Tabla 13.</b> Promedio del recuento de cepas donadoras (técnica de conjugación)	56
<b>Tabla 14.</b> Recuento de transconjugantes (técnica de conjugación).....	56
<b>Tabla 15.</b> Frecuencia de transconjugantes.....	56



## ii. ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> La estructura química de la vancomicina.....	10
<b>Figura 2.</b> Biosíntesis del peptidoglicano y mecanismo de acción de la vancomicina.....	12
<b>Figura 3.</b> Comparación entre la biosíntesis de la pared celular en bacterias Van-sensibles y Van-resistentes.....	13
<b>Figura 4.</b> Comparación de los grupos de genes <i>van</i> .....	21
<b>Figura 5.</b> Flujograma de trabajo.....	29
<b>Figura 6.</b> Placas con tiras de <i>E-test</i> (VAN) por cada cepa.....	34
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de especies aisladas para el estudio.....	41
<b>Figura 8.</b> Porcentajes de resistencia y susceptibilidad a antibióticos hallados en <i>E. faecium</i> .....	42
<b>Figura 9.</b> Porcentajes de resistencia y susceptibilidad a antibióticos hallados en <i>E. faecalis</i> .....	43
<b>Figura 10.</b> Porcentajes de aislamiento de <i>Enterococcus</i> por unidades de servicios.....	44
<b>Figura 11.</b> Número de especies seleccionadas por origen de las cepas.....	45
<b>Figura 12.a.</b> <i>E-test</i> realizado a cepa <i>Enterococcus faecium</i> EM0411.....	48
<b>Figura 12.b.</b> Aproximación del <i>E-test</i> realizado a cepa <i>Enterococcus faecium</i> EM0411.....	48
<b>Figura 13.</b> <i>E-test</i> realizado para cepas <i>Enterococcus faecalis</i> EC0507.....	49
<b>Figura 14.</b> <i>E-test</i> realizado a cepas <i>Enterococcus faecalis</i> EC1609.....	50

	Pag.
<b>Figura 15.</b> Cepa de <i>Enterococcus faecium</i> 127-2 de origen ambiental (Control Negativo).....	51
<b>Figura 16.</b> Valores en la CMI del <i>E-test</i> de las cepas aisladas.....	52
<b>Figura 17.</b> Cantidad de cepas aisladas y ubicación de la resistencia a vancomicina.....	53
<b>Figura 18.a.</b> Cepas que mantuvieron la resistencia después de la curación de plásmidos con SDS. ....	55
<b>Figura 18.b.</b> Cepas que perdieron la resistencia después de la curación de plásmidos con SDS.....	55
<b>Figura 19.</b> Cepas transconjugadas EC0507.....	58
<b>Figura 20.</b> Cepas transconjugadas EC0824.....	58
<b>Figura 21.</b> Extracción de ADN genómico y amplificadores del gen <i>vanA</i> .....	59
<b>Figura 22.</b> Amplificación de los genes <i>van</i> .....	60

## RESUMEN

En los últimos años los casos de infecciones causadas por enterococos resistente a vancomicina (ERV) han ido cobrando importancia debido a su capacidad innata para almacenar información e inclusive transferirla a otras cepas. Los ERV han sido aislados de Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), de infecciones de tracto urinario, bacteriemias, endocarditis, etc. Las dos especies clínicamente importantes son *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, las cuales portan genes de resistencia a vancomicina. El objetivo de esta investigación fue analizar genéticamente las cepas ERV del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI). Para ello se recolectaron cepas ERV y se realizó la evaluación molecular en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Lima. Se seleccionaron un total de 28 cepas, 82% (n = 23) correspondieron a la especie *E. faecium* y 18% (n = 5) a *E. faecalis*. Se determinó el nivel de resistencia a vancomicina con la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante el E-test, 23 cepas de *Enterococcus faecium* obtuvieron una CMI  $\geq 256\mu\text{g/mL}$ ; 5 cepas de *Enterococcus faecalis* mostraron subpoblaciones heterorresistentes a vancomicina dentro del halo de inhibición. Para determinar la ubicación de la resistencia se utilizó la prueba de curación de plásmidos resultando que el 96% (n = 22) de las cepas de *E. faecium* mantuvo la resistencia después del curado y el 100% de *Enterococcus faecalis* mostraron sensibilidad y transferibilidad, siendo la frecuencia de transferencia más alta de  $5 \times 10^{-3}$  para la cepa EC0507. Mediante PCR *múltiplex* se determinó la presencia de un sólo genotipo *vanA*, en todas las cepas *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. De esta manera se concluye que existe un solo genotipo *vanA* en los ambientes intrahospitalarios del HNGAI y que estos pueden ser transferibles.

**Palabras claves:** *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, enterococos resistentes, curación de plásmidos, resistencia a vancomicina, PCR *múltiplex*.

## **ABSTRACT**

In recent years cases of infections caused by vancomycin-resistant enterococci (VRE) have become increasingly important due to their innate ability to store information and even transfer to other strains. They were isolated from intensive care units (ICU), urinary tract infections, bacteremia, endocarditis, etc. The two clinically important species are *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, which carry genes for resistance to vancomycin. The objective of this research was to analyze genetically the VRE strains from Guillermo Almenara Irigoyen National Hospital (HNGAI). In order to accomplish this objective, VRE strains were collected and molecular evaluation was performed at the Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Molecular at the Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Lima. A total of 28 strains were selected, 82% (n = 23) corresponded to the species *E. faecium* and 18% (n = 5) *E. faecalis*. The level of resistance to vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by E-test; 23 strains of *Enterococcus faecium* obtained an MIC  $\geq 256\mu\text{g} / \text{mL}$ ; 5 strains of *Enterococcus faecalis* showed heteroresistance to vancomycin subpopulations within the inhibition zone. In order to determine the location of the resistance, Plasmids Curing test was used resulting that 96% (n = 22) strains of *E. faecium* resistance remained after curing and 100% of *Enterococcus faecalis* showed sensibility and transferability. The highest frequency of transference was  $5 \times 10^{-3}$  for strain EC0507. By multiplex PCR assay, the presence of the only *vanA* genotype was determined in all strains *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Thus we conclude that there is a single *vanA* genotype at the hospital environments of HNGAI and it would be transferable.

**Keywords:** *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, resistant enterococci, plasmids curing, resistance to vancomycin, multiplex PCR.

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Enterococcus* ha adquirido relevancia en estas últimas décadas principalmente debido al aumento de número de casos de infecciones intrahospitalarias (Fernández *et al.*, 2004). En el Perú, el género *Enterococcus sp.* se encuentra dentro de los agentes infecciosos más importantes, sobre todo por ser parte de las infecciones adquiridas en las Unidades de Cuidados Intensivos que en su mayoría tienen como agente etiológico bacterias resistentes a los antibióticos (Garza *et al.*, 2002).

Los factores que se asocian con mayor riesgo de colonización por enterococos resistentes a vancomicina (EVR), son la exposición al ambiente hospitalario, la permanencia en unidades de cuidados intensivos, la presencia de patología oncohematológica y quirúrgica, la condición de receptor de transplante, la insuficiencia renal en diálisis, los internamientos prolongados, la inmunosupresión y el uso de catéteres endovenosos (Ramos *et al.*, 2004). Las características propias de este microorganismo como el de sobrevivir en condiciones adversas, su capacidad de transmitirse en el hospital a través del personal y equipos contaminados y su resistencia intrínseca a antibióticos, sumado a las prácticas hospitalarias, como la elevada frecuencia de procedimientos invasivos y creciente utilización de antibióticos, han ayudado a que los enterococos se establezcan como flora colonizante, lo cual deja una ventana abierta a posibles brotes epidémicos que puedan ocurrir y conllevar a una elevada letalidad (30-40%), que precisamente está asociada al *Enterococcus* resistente a vancomicina (ERV) (Bazet *et al.*, 2005).

La detección temprana de los pacientes colonizados o infectados por enterococos resistentes a la vancomicina es uno de los factores esenciales para prevenir su diseminación nosocomial (Ramos *et al.*, 2004).

Desde 1997, el Instituto Nacional del Niño con auspicio de Organización Panamericana de la Salud inició la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos; pero sólo a partir del 2002 se incorporó la vigilancia de la resistencia en las bacterias de origen hospitalario (INS, 2007).

Se ha descrito la presencia de los enterococos resistentes a vancomicina en nuestro país a través de estudios de vigilancia epidemiológica en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza (Velásquez *et al.*, 2002) así como de reportes de casos en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, los cuales muestran la prevalencia de estos microorganismos sobre todo en pacientes hospitalizados con muestras provenientes de sangre, orina, punta de catéter central, líquido ascítico, abscesos, entre otros (Flores, 2007). Considerando que la vancomicina corresponde a antibióticos de uso restringido, la expresión de la resistencia constituye un problema de salud pública sumamente importante (Miguenz *et al.*, 2004).

Por el incremento de las ERV en su distribución en países latinoamericanos como: Chile, Ecuador, Brasil, Argentina, México, Colombia, Uruguay, es necesaria la realización de estudios a nivel molecular en *Enterococcus* que permitan conocer qué genes están implicados y circulan en los hospitales de Lima y son los que les confieren resistencia a vancomicina.

Para esta finalidad se plantea la realización del análisis de cepas aisladas del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen RED-ESSALUD, las cuales una vez recuperadas e identificadas por el sistema automatizado *Micro Scan* serán sometidas a una PCR múltiplex (Terreros *et al.*, 2010), con la finalidad de buscar genes de resistencia a vancomicina, entre los que se podrían encontrar: *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG*, que han sido descritos para *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*; generando así el conocimiento en cuanto a la prevalencia de marcadores

genéticos relacionados con esta resistencia lo cual permitirá su adecuada vigilancia epidemiológica en los centros de atención hospitalaria. La identificación de los genes asociados a la resistencia de las cepas en estudio, podría tener relevancia no solo en el tratamiento al paciente individual sino en la comunidad en general.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Enterococcus*

El término “enterococo” fue por primera vez acuñado por Thiercelin en una publicación del año 1899 en Francia, para referirse a unos nuevos diplococos Gram-positivos de origen intestinal. Tiempo después en el mismo año se describió el primer caso de endocarditis descrita por MacCallum y Hastings, la causa se le atribuyó a un microorganismo que denominaron *Micrococcus zymogenes*, trabajos posteriores darían a conocer que se trataba de un enterococo hemolítico (Murray, 1990). Más adelante en 1906 este microorganismo fue clasificado en el género *Streptococcus* por Andrewes y Holder, fue llamado *Streptococcus faecalis* al descubrirse en un paciente con endocarditis y por la semejanza que tenían con los microorganismos que habitan el intestino. El segundo microorganismo fecal fue descrito por Orla-Jensen en 1919, fue llamado *Streptococcus faecium* el cual compartía características similares con los demás miembros del género (Morrison *et al.*, 1997).

La clasificación e identificación de los estreptococos (enterococos) se basó por mucho tiempo en los grupos serológicos de Lancefield, hasta aquí todos los microorganismos eran designados según el orden del alfabeto, y se sabía para entonces que todos los streptococos (enterococos) poseían el antígeno del Grupo D y *Streptococcus bovis* y *S. equinus* también compartían este serotipo, pero más tarde serían reconocidos por Sherman (1937) como un grupo distinto al de los *Streptococcus*; los dividió en cuatro grupos: el grupo *Enterococci*, los ácido lácticos, el grupo viridans, y el grupo de los *Streptococcus pyogenes*; no obstante Kalina en 1970 propuso la creación del



nuevo género *Enterococcus* donde se ubicarían especies como *Streptococcus faecalius* y *Streptococcus faecium*, también propuso que se pasara a este nuevo género especies como *Streptococcus durans*, a la clasificación de subespecies como *Enterococcus faecium subsp. durans* (Wood *et al.*, 1995).

Pero no fue hasta 1984, por los experimentos de hibridación ADN-ADN y ADN-ARNr realizados por Schleifer y Kilpper-Balz, se oficializó el nuevo género *Enterococcus* al confirmar las diferencias moleculares y químicas que indicaban que las especies *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* tenían que ser nominales en el género *Enterococcus* ya que eran muy diferentes de los otros *Streptococcus* (Murray, 1990; Billström, 2008).

#### **2.1.1. Identificación**

Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos, de morfología esférica u ovoide de 0,6 a 2,0 x 0,6 a 2,5 µm; anaerobios facultativos, no tienen motilidad, con excepción de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Tienen gran capacidad de adaptabilidad a condiciones extremas como NaCl 6.5%, pH 9.6, son catalasa negativa, crecen a temperaturas de 10 a 45°C, pero su temperatura óptima es de 37°C, pueden sobrevivir mínimo por 30 min a 60°C, se desarrollan en presencia de 40% de bilis e hidrolizan la esculina; así como otros *Streptococcus* del grupo D, a diferencia de éstos dan negativo a la prueba PYR (L-pirrolindonil β-naltil-amida) (Murray, 1990). Por lo general producen, α o γ hemólisis, excepto algunas especies como *E. faecalis*, *E. durans* y *E. gallinarum* que pueden mostrar β-hemólisis, (Billström, 2008).

**Tabla 1. Grupos y especies de *Enterococcus* spp.** Hasta la actualidad se conocen las siguientes especies de *Enterococcus* que pertenecen a este género.

Grupo I Especie	Grupo II Especie	Grupo III Especie	Grupo IV Especie	Grupo V Especie
<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. asini</i>	<i>E. columbae</i>
<i>E. gilvus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. ceccorum</i>	<i>E. canis</i>
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. sulfurous</i>	<i>E. moraviensis</i>
<i>E. pallens</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. ratti</i>	<i>E. phoeniculicola</i>	
<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. villorum</i>		
<i>E. raffinosus</i>	<i>E. haemoperoxidus</i>			
<i>E. saccharolyticus</i>				
<p>*<i>Enterococcus</i>, especie CDC PNS-E-3            Esta especie fue aislada del tejido encefálico de un paciente de 11 meses en Honolulu, Honduras 2001.</p> <p>*<i>E. especie CDCPNS-E2</i>            Es una nueva especie del CDC que ha sido propuesta, aislada de hemocultivos en un paciente en Los Angeles 1997.</p>				

**Fuente:** (Koneman *et al.*, 2008)

## 2.2. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

Los enterococos resistentes a vancomicina (ERV), o más genéricamente resistentes a glucopéptidos, se aislaron inicialmente en 1986 en Francia y el Reino Unido y, poco después, en Estados Unidos (Cetinkaya *et al.*, 2000). La emergencia de estas resistencias fue incrementándose alrededor de esos años debido al uso de estos antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA). El genotipo más frecuente que se encuentra es del gen *vanA*, el cual está situado en un transposón y hace que sea más factible la transferencia y diseminación a otros patógenos, como es el caso de *Staphylococcus aureus*, que es un patógeno

portador de otras resistencias lo que hace que este incremento sea de alerta y preocupación para los tratamientos nosocomiales (Birgand, 2009).

Los enterococos también portan resistencia intrínseca a una amplia gama de antibióticos, entre ellos están: beta-lactámicos, lincosaminas, aminoglucósidos (a bajo nivel, pero se complementa en laboratorio con discos de altas concentraciones para descartar posibles sinergias con los betalactámicos) y trimetoprim-sulfametoxazol, esta se caracteriza por ser propia de la especie y se encuentran en su estructura genómica, excepto en las especies: *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus* que son resistentes por naturaleza a los glucopéptidos (Birgand, 2009).

**Tabla 2. Resistencias intrínsecas y adquiridas en *Enterococcus***

RESISTENCIA INTRÍNSECA	
Bajo nivel:	Penicilina,
betalactámicos.	ampicilina,
	piperacilina,
	cefalosporinas
Clindamicina	
Aztreonam	
Trimetoprim- sulfametoxazol	
Cotrimoxazol.	
Aminoglucósidos (bajo nivel)	Gentamicina, streptomicina

RESISTENCIA ADQUIRIDA	
Mecanismos	
Ampicilina – penicilina	Alteración de PB (característico en <i>Enterococcus faecalis</i> ).
Cloranfenicol	
Eritromicina	
Tetraciclinas	
Quinolonas	
Nitrofurantoína	
Aminoglucósidos (alto nivel)	Síntesis de enzimas bacterianas o por alteración de sitio blanco de acción.
Glucopéptidos	Vancomicina, teicoplanina.

Fuente: Bazet *et al.* 2005; Terreros, 2009.

Según las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), se ha establecido los siguientes puntos de corte para la investigación en laboratorio para este género mediante la técnica de difusión en agar Kirby Bauer, los cuales se indican en la tabla 3.

**Tabla 3. Puntos de corte para *Enterococcus* sp.**

ANTIBIÓTICO	DISCO	DIÁMETRO HALO EN DISCO (mm)			CMI µg / mL E-test		
		R	I	S	R	I	S
PENICILINAS							
Ampicilina	10 µg	≤16	-	≥17	≥16	-	≤8
GLUCOPEPTIDOS							
Vancomicina	30 µg	≤14	15-16	≥17	≥32	8-16	≤4
Teicoplanina	30 µg	≤10	11-13	≥14	≥32	16	≤8
AMINOGLUCOSIDOS							
Gentamicina	120 µg	6	7-9	≥10	>500	-	≤500
Estreptomicina	300 µg	6	7-9	≥10	>2000	-	≤1000
FLUOROQUINOLONAS							
Ciprofloxacino*	5 µg	≤15	16-20	≥21	≥ 4	2	≤1
Levofloxacino*	5 µg	≤13	14-16	≥17	≥ 8	4	≤2
Norfloxacino*	10 µg	≤12	13-16	≥17	≥16	8	≤4
TETRACICLINA							
Tetraciclina	30µg	≤14	15-18	≥19	≥16	8	≤4
MACRÓLIDOS							
Eritromicina	15µg	≤13	14-22	≥23	≥8	1-4	≤0.5
OTROS							
Rifampicina	5 µg	≤16	17-19	≥20	≥4	2	≤1
Nitrofurantoína*	300 µg	≤14	15-16	≥17	≥128	64	≤32

\*Estos discos son utilizados cuando el aislado es de vías urinarias.

\*Los antibióticos aquí citados, son los que se utilizan en nuestro país para el tratamiento.

Para la lectura de E-test se deberá tomar en cuenta los bordes de la zona de inhibición, la presencia de colonias dentro de esta zona indicará resistencia.

Fuente: (CLSI 2013, INS 2002.)

Los puntos de corte por los cuales se rigen las instituciones aquí en el Perú, son los proporcionados por el Instituto Nacional de Salud, ente gubernamental competente que rige para nuestro país, el cual toma como base los datos del CLSI para establecer sus normas (INS, 2002). Para ello se cuenta con un Programa de Vigilancia en donde se estudian las resistencias antimicrobiana de origen hospitalario, que incluyen las dos especies en estudio: *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* (INS, 2007).

### **2.3. RESISTENCIA A GLUCOPÉPTIDOS**

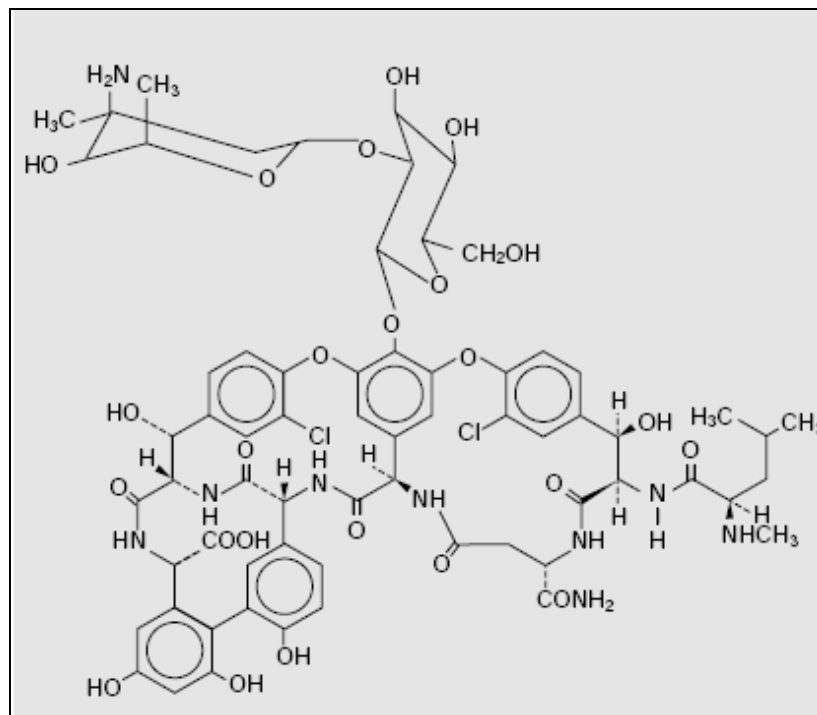
La vancomicina y teicoplanina, son los antibióticos glucopéptidos más utilizados en el tratamiento contra infecciones por enterococos resistentes a betalactámicos. La resistencia es inducible ya sea por vancomicina o teicoplanina pero se da mayormente por vancomicina (Courvalin, 1990).

La vancomicina es un antimicrobiano activo frente a Gram positivos, aislada originalmente de un actinomiceto *Streptomyces orientalis* (hoy llamado *Amycolatopsis orientalis*) en suelos de Indonesia y la India en 1955, y fue aprobada en 1958 por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA - USA), ha sido utilizada también para contrarrestar estafilococos productores de betalactamasas pero al encontrar nuevos antibióticos se dejó de usar por causar efectos secundarios indeseables, la emergencia de nuevas cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina favoreció el retorno del uso de la vancomicina a mediados de los ochentas (Amaury *et al.*, 2006).

La estructura de los glucopéptidos está conformada por un núcleo de péptido multianillo y en el núcleo un heptapéptido que está unido a un aminoácido leucina en el N-terminal, el cual será relevante para su actividad,

de esta manera el antibiótico se unirá por un extremo N-terminal al dímero D-alanil-D-alanina al extremo C-terminal del precursor peptidoglucano UDP-N-muranil en la superficie externa de la membrana de los Gram positivos (Mendez-Alvarez *et al.*, 2000).

La vancomicina, consta de un disacárido (vancomicina y glucosa), dos unidades hidroxycolorotirosina, tres sistemas fenilglicina sustituidos, N-metil-leukina y la amida del ácido aspártico, unidos todos ellos por una cadena peptídica de siete miembros, por ello se le conoce también como una estructura heptapeptídica (Flórez, 2003).



**Figura 1. La estructura química de la vancomicina.** Consta de un disacárido (vancosamina y glucosa), dos unidades hidroxycolorotirosina, tres sistemas fenilglicina sustituidos, N-metil-leukina y la amida del ácido aspártico; todos unidos por una cadena peptídica de siete miembros (Revilla, 2009).

Su acción antibacteriana se limita a bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* muestra sensibilidad, inclusive los que son resistentes a meticilina, la sensibilidad puede variar dependiendo de las concentraciones,

por ejemplo las que son inferiores a 5 µg/mL pueden ser inhibidas, pero algunas cepas pueden requerir concentraciones mayores a 20 µg/mL. La vancomicina no puede absorberse por vía oral, sobre todo cuando se da tratamiento para infecciones sistémicas en pacientes que presentan insuficiencia renal grave, aunque se ha visto que pacientes con esta insuficiencia o con colitis pseudomembranosa dan una respuesta favorable a la administración vía oral por lo que recomiendan que en ambos casos se monitorice periódicamente al paciente para evitar la toxicidad. La vancomicina suele ser el fármaco de primera elección en cuanto a infecciones graves con *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, penicilinas isoxazólicas y cefalosporinas de primera generación, aunque existen cepas que pueden tolerar la acción bactericida y en estos casos se utilizan concentraciones mayores del antibiótico (Mediavilla, 1997; Flórez, 2003).

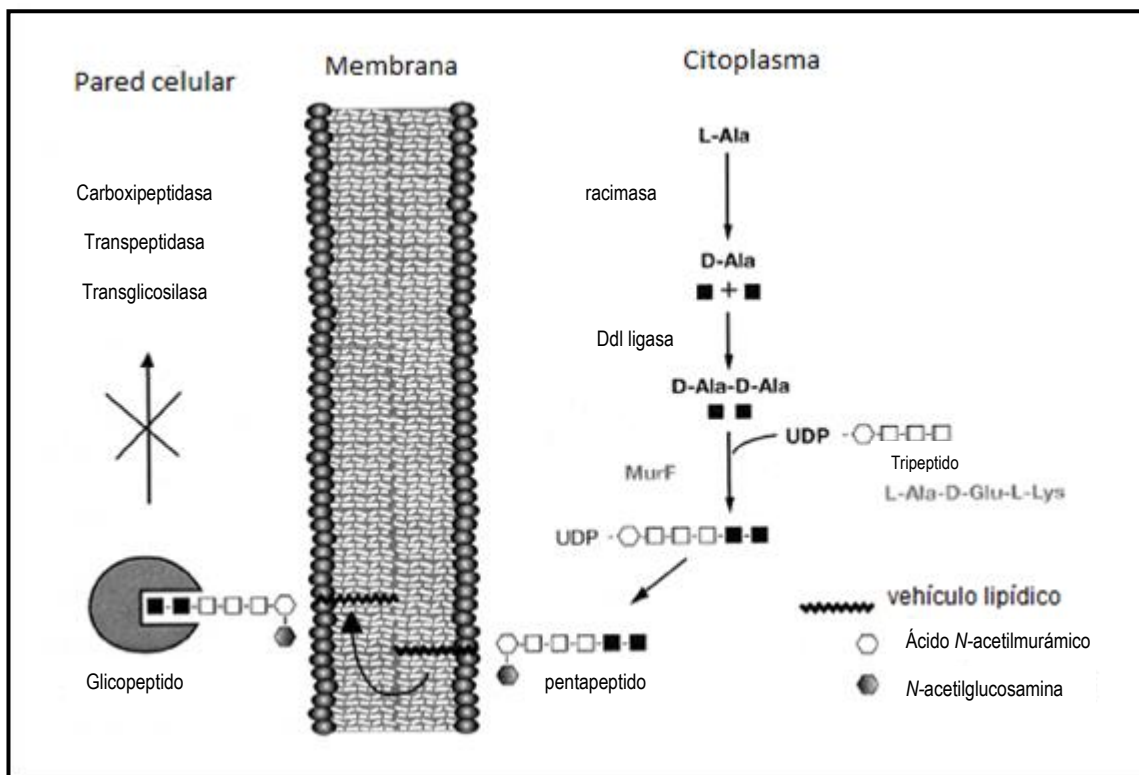
**Tabla 4. Actividad antibacteriana de los Glucopéptidos**

<b>BACTERIAS GRAM POSITIVAS</b>	<b>VANCOMICINA</b> CMI ≤ 4µg/mL	<b>TEICOPLANINA</b> CMI ≤ 8µg/mL
<b><i>Streptococcus</i> grupos: A, B, C, G</b>	S	S
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	S	S
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	S	S
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>	S*	S*
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (sensibles y resistentes a meticilina)</b>	S	S
<b><i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos ( - )</b>	S	S*
<b><i>Corynebacterium jeikeium</i></b>	S	S
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	S	S
<b>BACTERIAS ANAEROBIAS</b>		
<b><i>Clostridium difficile</i></b>	S	S
<b>S* : menor sensibilidad</b>		
<b>S : sensible</b>		

Fuente: Mediavilla, 1997; Flórez, 2003.

### 2.3.1. Mecanismo de acción de la vancomicina y resistencia

La vancomicina actúa sobre el dipéptido terminal D-Ala-D-ala de los precursores del peptidoglicano que se encuentran en la pared de la membrana citoplasmática externa, impiden de esta forma el acceso a las transglucosilasas, transpeptidasas (Depardieu *et al.*, 2007).

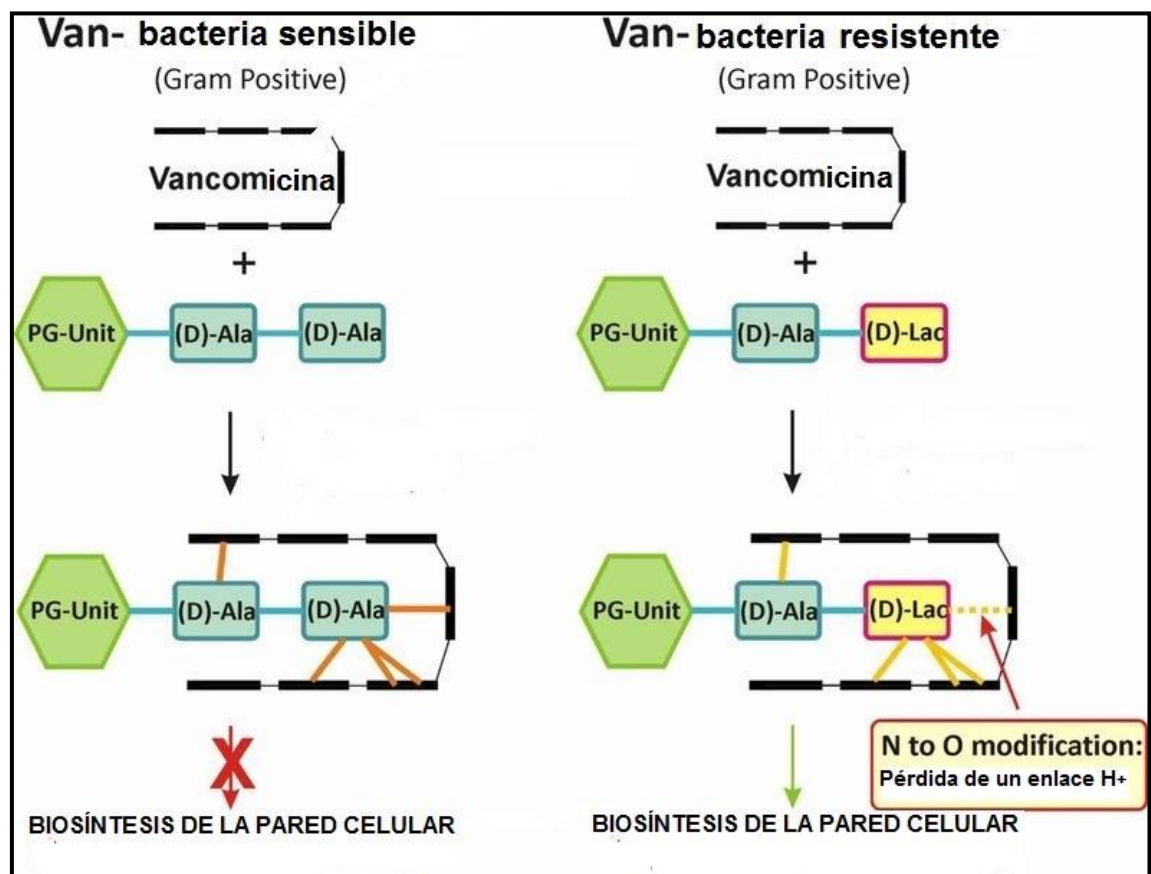


**Figura 2. Biosíntesis del peptidoglicano y mecanismo de acción de la vancomicina.** La unión del antibiótico al C-terminal D-Ala-D-Ala del precursor del peptidoglicano evita reacciones de catalización por la transglucosilasas, transpeptidasas y el D,D-carboxipeptidasas. Ddl, d-Ala:d-Ala (ligasa); MuRF, una proteína sintetasa; UDP, difosfato Uracilo. (Fuente: Courvalin, 2006).

La unión de la vancomicina (*glycopeptide*) al dipéptido (D-Ala-ala) inhibe la transglucosilación y transpeptidación, reacciones necesarias para el ensamblaje del peptidoglicano naciente, lo cual conlleva a detener la biosíntesis de la pared bacteriana, la división celular y el crecimiento.



La resistencia a los glucopéptidos en los enterococos se genera por la modificación en el sitio de unión a los precursores de peptidoglicano (esto mediado por la presencia de operones que codifican enzimas para producir baja afinidad) y que el terminal D-Ala-D-ala cambie a D-Ala-D-Lac (VanA, VanB, VanD) o también D-Ala-D-Ser (VanC, VanE y VanG), estas modificaciones hacen que la afinidad al sitio de unión de la vancomicina por los precursores de peptidoglicano que son de alta afinidad normalmente, disminuya, creando así una cepa resistente.



**Figura 3. Comparación entre la biosíntesis de la pared celular en bacterias Van-sensibles y Van-resistentes.** (Fuente: <http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/groups/cytochrome/glykopeptide>. 2014. Dr. Cryle).

Los sitios de unión de bolsillo a la vancomicina por los precursores muestran una afinidad mil veces más baja cuando se trata del cambio hacia D-Ala-D-Lactato, ello resulta de las fuerzas de repulsión que conducen a una baja afinidad de la vancomicina y el precursor, y si se trata del cambio a D-Ala-D-Serina la baja afinidad es 6 veces menor, debido a que el grupo hidroximetilo de la serina es más voluminoso que el grupo metilo de la alanina (Courvalin, 2006; Depardieu *et al*, 2007).

Los antibióticos glucopéptidos, tanto vancomicina y teicoplanina, son los más usados en la terapia clínica contra los Gram positivos desde 1958, sin embargo recientemente, se siguen describiendo el incremento de la resistencia bacteriana a la vancomicina en distintas partes del mundo (Flórez, 2003).

### **2.3.2. GENOTIPOS DE RESISTENCIA**

Hasta ahora se han descrito 6 genes que están implicados en la resistencia a vancomicina; el mecanismo que utiliza la vancomicina es sobre la formación de precursores de peptidoglicano en la síntesis de la pared bacteriana, bloqueando los pasos de la transpeptidación y transglicosilación vitales para la formación y entrecruzamiento de la pared celular. Los grupos de genes que codifican estos fenotipos han sido descritos en muchas partes del mundo mostrando mucha heterogeneidad tanto fenotípica como genotípicamente, siendo el genotipo *VanA* y *VanB* los más comúnmente encontrados en las especies de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* (Sujatha & Praharaj *et al.*, 2012).

La tabla 5 muestra los genotipos de resistencia a vancomicina en enterococos por orden alfabético.

**Tabla 5. Genotipos de resistencia a vancomicina en enterococos**

Genotipo y Nivel de resistencia intrínseca y adquirida						
Características de la cepa	Resistencia a alta <i>vanA</i>	Resistencia variable <i>vanB</i>	Resistencia moderada <i>vanD</i>	Baja resistencia		Resistencia intrínseca: <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i> , de bajo nivel, tipo <i>vanC1/C2/C3</i>
				<i>vanG</i>	<i>vanE</i>	
CMI (mg/L)						
Vancomicina	64 – 100	4 – 1000	64 – 128	16	8 - 32	2 – 32
Teicoplanina	16 - 512	0.5 – 1	4 - 64	0.5	0.5	0.5 – 1
Conjugación	Positiva	Positiva	negativa	Positiva	negativa	Negativa
Elementos móviles (transposones)	<i>Tn1546</i>	<i>Tn1547</i> ó <i>Tn1549</i>	---	---	---	---
Expresión	Inducible	Inducible	Constitutiva	Inducible	Inducible	Constitutiva inducible
Localización	Plasmídica - cromosomal	Plasmídica – cromosomal	Cromosomal	Cromosomal	Cromosomal	Cromosomal
Blanco a modificar	d-Ala-d-Lac	d-Ala-d-Lac	d-Ala-d-Lac	d-Ala-d-Ser	d-Ala-d-Ser	d-Ala-d-Ser

Fuente: Courvalin *et al.*, 2006.

Los fenotipos VanA y VanB están codificados por los genes *vanA* y *vanB*, respectivamente y que se caracterizan por expresar un alto nivel de resistencia a la vancomicina con una CMI entre 64µg/mL -  $\geq$  1000 µg/mL; estos genes son inducibles por bajas concentraciones de vancomicina y cefalosporinas (Depardieu *et al.*, 2007).

### 2.3.2.1. Fenotipo VanA

El fenotipo VanA está codificado por genes que se localizan en un operón *vanA*, el cual se ha reportado en un transposón (*Tn1546* con 10851 pb), que puede estar presente en un plásmido o cromosómicamente y está ligado a una modificación en el extremo carboxiterminal del pentapéptido del

peptidoglicano, realizando el cambio de una ligasa (D-Ala-D-Ala) por un D-Ala-D-Lactato, perdiendo uniones (puentes de hidrógeno) (Arthur & Courvalin, 1993; Domingo, 2007). Se regula por un sistema de dos componentes que son codificados por los genes *vanS* y *vanR*, los cuales regularán la transcripción de los genes *vanHAX*, este sistema se activa por la presencia de antibióticos glucopéptidos extracelulares, lo que provoca que un residuo de histidina en el sensor *vanS* se autofosforile, este grupo fosforilo es transferido a un residuo de aspartato del regulador *vanR* el cual incrementa su afinidad por las regiones promotoras *vanPR* y *vanPH*, activando de esta manera la transcripción de los genes de resistencia (Santos-Beneit *et al.*, 2014).

Los tres genes asociados a la resistencia son *vanH*, *vanA* y *vanX*, éstos codifican las proteínas necesarias para la expresión de la resistencia; *vanH* codifica una deshidrogenasa que convierte el piruvato en D-Lac; *vanA* codifica una ligasa para D-Ala-D-Lac y *vanX* una D,D-dipeptidasa que separa los dipéptidos D-Ala-D-Ala para asegurar que solo se alteren los terminales de precursores de peptidoglicanos y se forme D-Ala-D-Lac. Los genes *vanY* y *vanZ* codifican proteínas accesorias, la primera una carboxipeptidasa que elimina residuos D-Ala terminales en los peptidoglicano que ya hayan sido incorporados y la segunda codifica una resistencia baja a teicoplanina por un mecanismo que aún no ha sido descrito (Terreros, 2009; Santos-Beneit *et al.*, 2014).

Los mecanismos de resistencia a glucopéptidos son clasificados dependiendo de qué sistema de resistencia posean, si son inducibles y si pueden ser transmisibles o no. Además el genotipo *vanA* ha sido descrito en: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. avium* y *E. gallinarum* (Mendez-Alvarez *et al.*, 2000).

### 2.3.2.2. Fenotipo VanB

El fenotipo VanB presenta resistencia moderada, con un CMI entre 8 y 16 µg/mL o alta como 32 µg/mL y se caracteriza por ser susceptible a teicoplanina desde 4 a  $\geq 1$  µg/mL; son transferibles de manera que un elemento genético móvil porta esta resistencia y se sitúa en el transposón *Tn1547* de 64 kb, ubicándose en el cromosoma o plásmido; han sido descritos en *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* y *E. raffinosus*, y el bajo nivel de resistencia que exhiben estas cepas hace complicado el diagnóstico fenotípicamente (Santos-Beneit *et al.*, 2014).

Los genes que regulan la resistencia a vancomicina son homólogos a los que presenta el operón *vanA*, pero difieren en el orden de ubicación que tienen los genes de resistencia en el operón *vanB*. Son dos componentes genéticos los que regulan este sistema de resistencia *vanR<sub>B</sub>* y *vanS<sub>B</sub>*, y los genes que se encargan de la resistencia misma son *vanH<sub>B</sub>*, *vanB* y *vanX<sub>B</sub>*. Los genes encargados que permiten sintetizar precursores que terminen en D-Ala-D-Lac son los *vanB* y *vanH<sub>B</sub>*, el primero encargándose de sintetizar ligasas para unir D-Lac a D-Ala y la segunda codifica una deshidrogenasa que sintetiza D-Lac a partir de piruvato (Depardieu *et al.*, 2007).

Los genes *vanX<sub>B</sub>* y *vanY<sub>B</sub>* codifican la síntesis de una D,D-dipeptidasa y una D,D-carboxipeptidasa (enzima dependiente de  $Zn^{+2}$ ) respectivamente, los cuales servirán para eliminar los precursores que terminen en D-Ala-D-Ala (Santos-Beneit *et al.*, 2014).

El gen *vanW* es un gen accesorio que hasta ahora se desconoce su función; *vanY<sub>B</sub>* no ha sido encontrado en todas las cepas aisladas, se ha demostrado su heterogeneidad de secuencias de ADN para la ligasa VanB lo

que sugirió diferentes subtipos: VanB-1, VanB-2 y VanB-3. El sistema de activación de los genes de resistencia en el operón *vanB* no se induce por la presencia de teicoplanina (a pesar que éste si puede inducir la síntesis de proteínas relacionadas a *vanA*), sin embargo la presencia de vancomicina en el medio puede inducir la activación de este sistema de regulación, de esta manera si sobreexponemos con vancomicina a una cepa con el grupo de genes *vanB* (teicoplanina-S) esta cepa se puede volver resistente a teicoplanina (Terreros, 2009; Depardieu *et al.* 2007; Santos-Beneit *et al.*, 2014).

#### **2.3.2.3. Fenotipos VanC, VanD, VanE y VanG**

El fenotipo VanC presenta resistencia constitutiva de bajo nivel a vancomicina y teicoplanina. Están ligados de forma intrínseca en *E. gallinarum* (*vanC1*), *E. casseliflavus* (*vanC2*) y *E. flavescens* (*vanC3*). Existen tres grupos de genes que codifican tres proteínas necesarias para esta resistencia: *vanC*, *vanXY<sub>C</sub>*, una cataliza la síntesis de D-Ala-D-Ser y la otra elimina los precursores que terminan en D-Ala-D-Ala, *vanT* codifica una proteína que unida a la membrana produce D-Ser (Depardieu *et al.*, 2007). Los fenotipos VanD, VanE, VanG han sido hallados hasta la actualidad en el cromosoma a diferencia de los fenotipos más abundantemente encontrados, VanA y VanB (Depardieu *et al.*, 2007).

El fenotipo VanD es expresado por un genotipo conocido como *vanD*, el cual fue descrito por primera vez en un hospital en *New York* en el año 1991 (Cetinkaya *et al.*, 2000). Este fenotipo es de resistencia adquirida y se debe a que se producen precursores de peptidoglicano con la terminación D-Ala-D-Lac. La resistencia que se expresa es moderada y constitutiva, presentando un CMI de 64 a 128 µg/mL (Sacramento, 2010). Muestra una organización similar

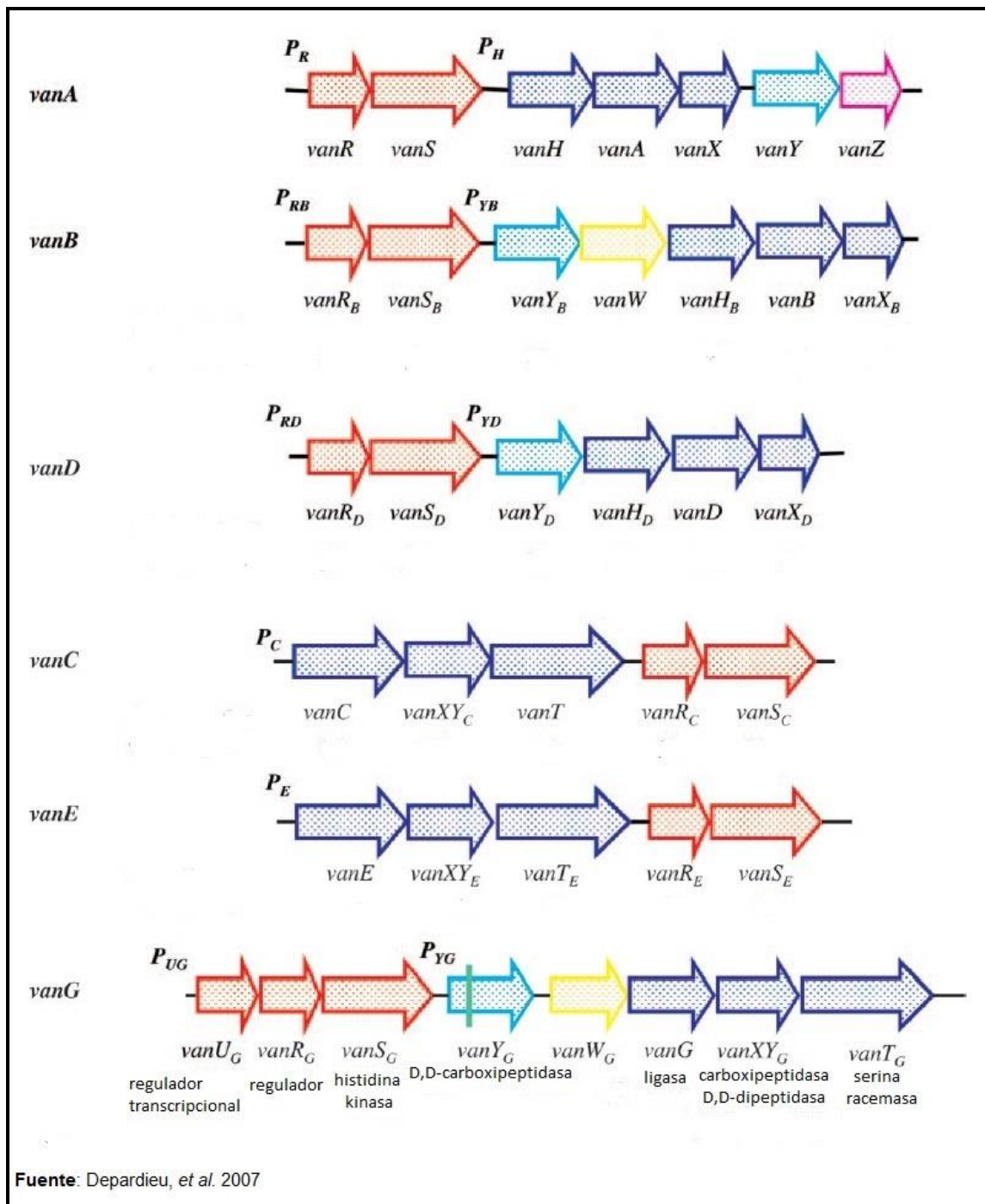
en cuanto a la distribución de los genes que expresan la resistencia y sus homólogos *vanA* y *vanB*, pero carece de los genes homólogos *vanZ* y *vanW*; en este caso serán los genes reguladores *vanS* y *vanR* los necesarios para que se active la expresión o inactivación de los genes de resistencia (Courvalin, 2006). Las cepas de tipo VanD se expresan de forma constitutiva, es decir que el operón *vanD* es activado constantemente debido a una mutación en el sistema de regulación de 2 componentes, específicamente por mutaciones que se expresan en el sensor VanS<sub>D</sub> (que implica un desplazamiento del marco de lectura) y una mutación en el regulador VanR<sub>D</sub>, eliminando de esta forma la vía de susceptibilidad por inactivación de una ligasa DdL, lo que le proporciona mayores niveles de resistencia antibiótica (Courvalin, 2006; Depardieu, *et al.*, 2007).

El fenotipo VanE fue descrito en una cepa de *Enterococcus faecalis* BM4405, muestra bajos niveles de resistencia a vancomicina con un CMI de 16 µg/mL, es susceptible a teicoplanina con un CMI de 0.5 µg/mL y sintetiza precursores de peptidoglicano con terminaciones D-Ala-D-Ser. La expresión de su resistencia se caracteriza por ser intrínseca y puede ser inducible por vancomicina. La organización de los genes en *vanE* es idéntico al del operón *vanC* (Centinkaya *et al.* 2000; Courvalin, 2006).

El fenotipo VanG se caracteriza por poseer bajos niveles de resistencia a vancomicina, mostrando un CMI de 16 µg/mL y una susceptibilidad a teicoplanina de 0.5 µg/mL (CMI), este tipo de resistencia fue descrito por primera vez en una cepa *E. faecalis* WCH9 (Pérez-Hernández, 2002). Este fenotipo está codificado por un operón llamado *vanG* y la inserción de este elemento en el cromosoma ha sido caracterizado en una cepa de *E. faecalis* BM4518 (Boyd, *et al.* 2006). El fenotipo VanG sintetiza precursores de

peptidoglicano con terminación en D-Ala-D-Ser, se encuentra en el cromosoma y se compone de 7 genes agrupados en: *vanU<sub>G</sub>*, *vanR<sub>G</sub>* y *vanS<sub>G</sub>*, los cuales se encargan de codificar un sistema de regulación putativo; *vanR<sub>G</sub>* y *vanS<sub>G</sub>* que tienen la misma función que en el fenotipo VanD, este sistema regulador de 3 genes se cotranscribe desde un promotor PU<sub>G</sub> mientras induce la transcripción de los genes *vanY<sub>G</sub>*, *vanW<sub>G</sub>*, *vanG*, *vanXY<sub>G</sub>* y *vanT<sub>G</sub>* (genes necesarios para expresar la resistencia), los cuales se inician a partir del promotor PY<sub>G</sub> (Boyd *et al.*, 2006; Depardieu *et al.* 2007).





**Figura 4. Comparación de los grupos de genes *van*.** Las flechas abiertas representan secuencias de codificación (flechas rojas, genes reguladores; flechas púrpura, los genes necesarios para la resistencia; flechas celeste, genes accesorios; flechas rosadas y flechas amarillas, los genes de función desconocida) e indican la dirección de transcripción. La barra vertical en *vanY<sub>G</sub>* indica una mutación en el marco de lectura que predice una proteína truncada (Depardieu et al. 2007).

### 2.3.3. Heterorresistencia

En 1992 se probó la transferibilidad de la resistencia a vancomicina desde *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus* mediante conjugación bajo condiciones de laboratorio, y en 1996 se describió una cepa *Staphylococcus aureus*, en un paciente, con sensibilidad disminuida a vancomicina (CMI 8 µg/mL). Las cepas que presentan sensibilidad disminuida (con un CMI entre 2-8 µg/mL) en *S. aureus* se denominaron inicialmente VISA (*vancomycin intermediate S. aureus*), y debido a la resistencia cruzada que existe entre los diferentes glucopéptidos luego se acuñó el término GISA (*glycopeptide intermediate S. aureus*) (Flórez, 2003).

En algunos casos se puede encontrar en una misma colonia de estafilococos cepas muy sensibles (con un CMI <2 µg/mL) y otras bacterias con sensibilidad disminuida, a este fenómeno se le denominó heterorresistencia, lo que significa que para el tratamiento clínico se debe alcanzar concentraciones mayores en el lugar de la infección para conseguir una buena respuesta (Flórez, 2003). Estas cepas muestran una reducción a la sensibilidad debido a que su mecanismo de resistencia consiste en secuestrar glucopéptidos de la periferia lo que conlleva a un engrosamiento de la pared celular oponiéndose así a que las drogas lleguen a su destino (Flórez, 2003).

## 2.4. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA

Actualmente las pruebas de rutina utilizadas en el laboratorio, son Kirby Bauer, que suele ser muy convenientes por su bajo costo, no obstante también se puede complementar estos estudios con sistemas automatizados de

identificación como el *Micro Scan*, que resulta una buena combinación para la detección de ERV (enteroco resistente a vancomicina), pero en cuanto a la detección de cepas vancomicina intermedia y cepas que presentan resistencia a vancomicina de bajo nivel, la utilización de la prueba de Epsilon test ó *E-test* logra dar resultados más sensibles acompañada de una buena interpretación en la zona de inhibición, no obstante su alto costo no favorece su utilización como prueba de rutina (Schulz *et al.*, 1993).

La prueba de Epsilon o de *E-test* consiste en una tira con una escala expresada en gradientes del antibiótico en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) por mL, desde 0,016  $\mu\text{g/mL}$  hasta 256  $\mu\text{g/mL}$ , utilizada para evaluar y vigilar organismos problemáticos como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y en este caso para determinar la resistencia de bajo nivel (CMI, 32 hasta 128  $\mu\text{g/mL}$ ) y alto nivel (CMI,  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ ) a vancomicina (Schulz *et al.*, 1993).

## 2.5. DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES *van*

Estudios recientes han determinado que el fenómeno de la resistencia está presente desde tiempos remotos, el análisis metagenómico de sedimentos de la capa del subsuelo glaciar de *Bering* con hace más de 30 000 años de antigüedad, permitieron revelar la presencia de diversos genes, entre ellos los que codifican la resistencia a betalactámicos, tetraciclinas y glucopéptidos y se encontró un grupo de genes similar al operón de resistencia básico *vanH-vanA-vanX* (*vanHAX*) (D'Costa *et al.*, 2011).

En consecuencia, el desarrollo de nuevos métodos de detección en el diagnóstico clínico actualmente ha sido crucial para la medicina, hoy en día se

realizan diferentes pruebas moleculares como el PCR (en inglés *Polimerase Chain Reaction*) que sirve para detectar diferentes tipos de genes *van*, y de igual forma se implementan metodologías como PCR en tiempo real (Santos-Beneit *et al.*, 2014).

A través de la PCR-Múltiple se permite la detección de varios genes de resistencia *van*: *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, también la identificación específica de *E. faecium* y *E. faecalis*, la cual consiste en amplificar regiones específicas de porciones de los genes mencionados, teniendo en cuenta la temperatura de *annealing* para poder usarlas de manera simultánea en una sola reacción (Dutka, *et al.* 1995; Pérez-Hernández, 2002; Pangallo *et al.*, 2004).

Diversas investigaciones muestran la necesidad de contar con una identificación precisa de las diferentes especies de *Enterococcus* así como de las características de los genes de resistencia que determinan la resistencia de bajo nivel y si es adquirida o intrínseca. En modelos experimentales animales con endocarditis, por ejemplo, se ha demostrado que la resistencia de bajo nivel de los enterococos produce fracaso terapéutico y ésta no es detectable por las pruebas de sensibilidad automatizada ni las de difusión en disco (Pangallo, *et al.* 2004).

La utilización de estos métodos moleculares permite además trabajar con muestras directas acortando el tiempo de diagnóstico y siendo más específico, permite la rápida detección de resistencia a glucopéptidos y en particular los que tienen bajos niveles de resistencia (Dutka *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2001; Domingo *et al.*, 2005; Billstrom, 2008; Sacramento, 2010)

## 2.6. EPIDEMIOLOGÍA

Los enterococos son comúnmente encontrados causando enfermedades hospitalarias, las especies más importantes por su relación con infecciones humanas son: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, causando endocarditis, bacteriemias, infecciones de tracto urinario, enfermedades al sistema nervioso central, infecciones pélvicas e intra-abdominales y además porque presentan múltiples resistencias a antibióticos. En Estados Unidos, los enterococos vancomicina resistentes aislados de nosocomios han sido reportados en 9 de los 33 estados a través del *National Nosocomial Infections Surveillance* de la CDC, este organismo recaba datos y prueba la susceptibilidad de cepas aisladas de enterococos, reportándose que entre los años 1989-1993 se incrementó la resistencia del 0.4% en 1989 a un 13% en 1993, variando según el origen del aislamiento: abscesos intrabdominales, piel, tejidos blandos y sangre (CDC, 1993).

En Australia en el año 1998, se reportó la emergencia de ERV en un paciente que recibió un transplante de riñón, era originario de Taiwán y fue a Australia especialmente para el procedimiento, luego de la intervención mostró en aislados de sangre *Enterococcus faecalis* que poseía el fenotipo VanB, y más adelante después del tratamiento con teicoplanina mostró el fenotipo VanA; realizando las pruebas genotípicas se dilucidó que poseía el gen *vanB*. Todos los resultados obtenidos en este estudio describe el uso del PCR múltiplex para determinar los genes específicos que codifican la resistencia a vancomicina (Bell *et al.*, 1998).

Desde entonces, se han descrito ERV como causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo, aunque con una incidencia variable según el área geográfica y las instituciones hospitalarias (Cetinkaya *et al.*, 2000; Klare *et*

*al.*, 2003). La prevalencia de ERV en España, al igual que en algunos estados europeos, permanece baja, con valores inferiores al 5% (2,2% de *E. faecium* resistente a vancomicina en España en el 2006), aunque se han descrito de forma esporádica brotes monoclonales y policlonales causados por *E. faecalis* y *E. faecium* de los genotipos *vanA* o *vanB* en Valencia, Santander, Palma de Mallorca, La Coruña, La Rioja y Soria, y todos éstos han sido infecciones autolimitadas (Torres *et al.*, 2008). En Brasil el primer caso reportado por un ERV fue en 1998, causando una grave septicemia, por *Enterococcus faecium*, en un paciente de 9 años de edad con una anemia aplásica (Dalla *et al.*, 1998). A diferencia de los países en desarrollo la aparición de cepas resistentes a vancomicina en el Perú, es reciente desde el año 2000 y 2002 (INS 2007); teniendo una prevalencia de 3.5% en el 2002 (Velásquez *et al.*, 2002), 11.5% en el 2007 (Flores, 2010).

De esta manera *Enterococcus spp.* ha ido cobrando importancia en toda América Latina, en algunos países como Uruguay desde 2005, está convirtiéndose en un problema emergente, mencionando principalmente a *Enterococcus faecium* y reportándose genotipos desde el *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanC3*, *vanD*, *vanE* y *vanG*, de los cuales sólo tienen un gran impacto los genes *vanA* y *vanB* por su capacidad de transferencia entre especies y géneros diferentes (Bazet *et al.*, 2005).

La epidemiología de los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) parece ser diferente en América Latina y en Europa. Los análisis genéticos de epidemiología molecular han sido de gran ayuda para conocer la epidemiología de los ERV (estudio del ADN cromosómico por electroforesis en campo pulsado, RFLP, estudios del ADN plasmídico y de los genes de resistencia mediante PCR); estos análisis han permitido demostrar la rápida diseminación

intra e interhospitalaria de un solo clon, así como la participación de más de un clon y de más de una especie en un mismo brote, siendo *Enterococcus faecium* la especie aislada con mayor frecuencia (Ayats *et al.*, 2003).

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

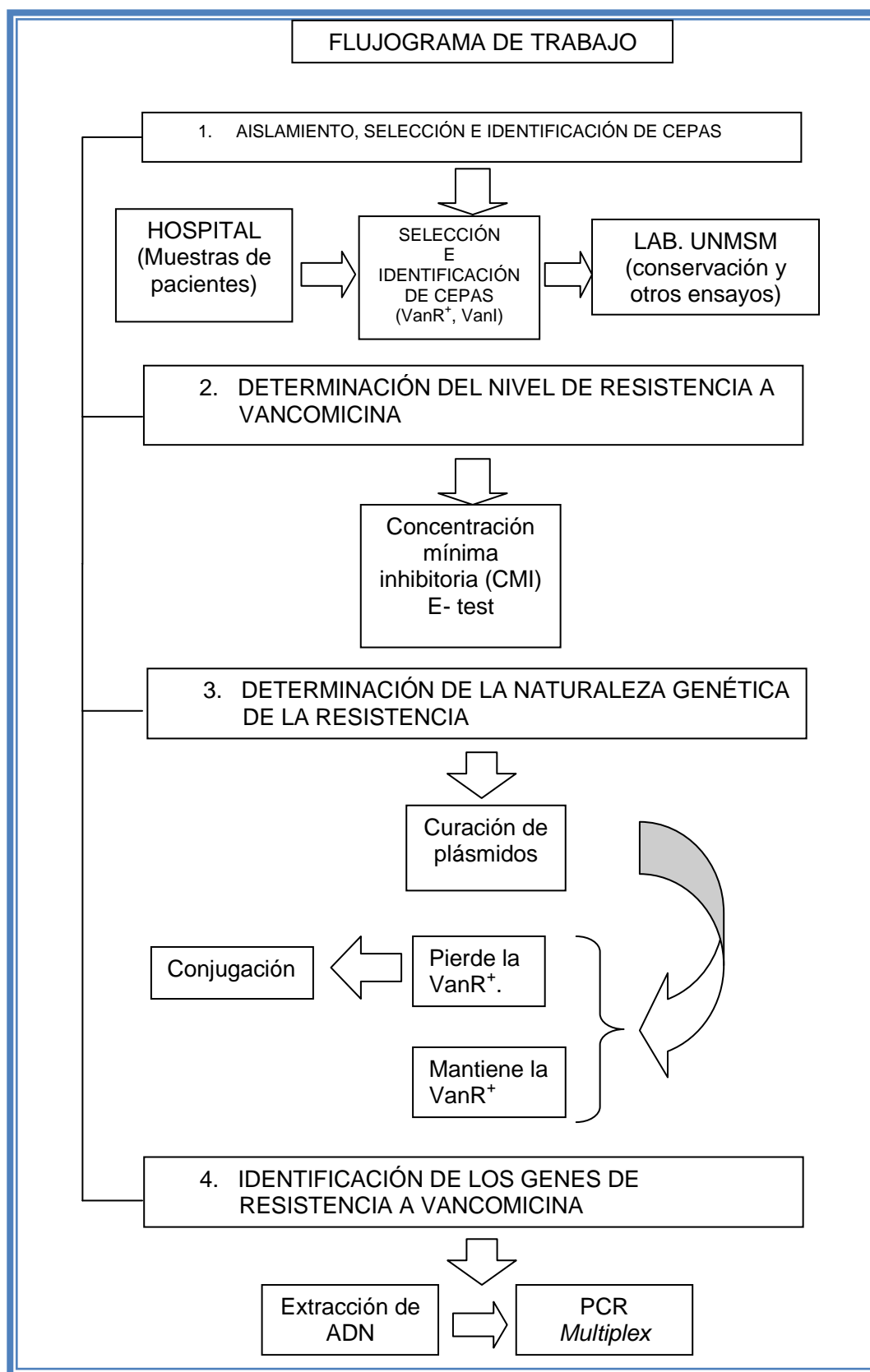
Realizar un estudio genético molecular en las cepas *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina aisladas del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen RED-ESSALUD.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 3.2.1. Aislar, seleccionar e identificar cepas de *Enterococcus*.
- 3.2.2. Determinar el nivel de resistencia a vancomicina de los enterococos en estudio.
- 3.2.3. Determinar la naturaleza genética de la resistencia a vancomicina.
- 3.2.4. Identificar los genes de resistencia a vancomicina de *Enterococcus*.



#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 5. Flujoograma de trabajo.** Síntesis del trabajo realizado.

\*VanR<sup>+</sup> : Vancomicina resistente, VanI: Vancomicina intermedia.

#### 4.1. Material biológico

Se utilizaron un total de 28 cepas aisladas en el Laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI), que fueron resistentes, intermedias a la vancomicina y 1 cepa de origen ambiental *E. faecium* 127-2, 1 cepa control negativo para la resistencia a vancomicina *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* JH2-2 F<sup>-</sup> libre de plásmido con resistencia cromosómica Fus<sup>r</sup> Rif<sup>r</sup>, pertenecientes al cepario del Lab. Microbiología Molecular y Biotecnología de la UNMSM (Abadía *et al.* 2005; Jacob *et al.* 1974).

**Tabla 6. Cepas utilizadas en el estudio**

CEPAS PROBLEMA	CEPAS ATCC	CEPAS AMBIENTALES
Efm0411		
Efc0507	<i>E. faecalis</i> 29212	Efm 127-2 (control)
Efm0609	<i>E. faecalis</i> JH2-2	
Efm1102		
Efm1313		
Efm2218		
Efm2521		
Efm2708		
Efm2204		
Efm2207		
Efm1418		
Efc08016		
Efm0923		
Efm1008		
Efm2318		
Efm0713		
Efm2825		
Efm2916		
Efm0212		
Efm2206		
Efc 1609		
Efc 1917		
Efm1916		
Efm0406		
Efm0602		
Efc 0824		
Efm1818		
Efm0822		

#### 4.2. Aislamiento, selección e identificación de las cepas de *Enterococcus*

Se aislaron cepas de origen hospitalario que fueron resistentes e intermedias a la vancomicina, y una cepa de origen ambiental Efm 127-2 como control. Las cepas seleccionadas asociadas a la resistencia a vancomicina fueron seleccionadas de cualquier aislado y origen, de pacientes hospitalizados en un período de seis meses, desde noviembre del 2010 hasta abril del 2011 del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen RED ESSALUD, estos aislamientos están resumidos a continuación en la Tabla 7.

**Tabla 7. Muestras procesadas en los servicios del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.** Síntesis de la procedencia de cada cepa por muestra, servicio. UCI: unidad de cuidados intensivos.

MUESTRAS	SERVICIO
Orina	Neumología Emergencia Urología Med. Interna I UCI Neonatología Neurología Nefrología
Sangre	Cirugía hígado y vías biliares Emergencia Nefrología UCI Med. Interna 1 Clínica pediátrica.
Catéter endovenoso	UCI
Absceso	Transplante de hígado.
catéter venoso central	UCI
Líquido ascítico	Transplante de hígado.
Líquido diálisis peritoneal	Nefrología
Catéter umbilical	Neonatología
Líquido intrabdominal	Medicina interna 1

Se realizó el aislamiento y selección de las cepas siguiendo el protocolo del INS para muestras clínicas (INS, 2002). Los aislados fueron sembrados en Mueller Hinton antes de pasar al sistema de *Micro Scan*® *Siemens (UK)* para su identificación y evaluación preliminar de resistencia en el Servicio de Microbiología del HNGAI. Las cepas luego fueron transportadas en viales con agar TSA (T° amb.) al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM.

#### **4.2.1. Conservación de cepas**

Posteriormente las cepas de *Enterococcus* fueron sembradas en tubos conteniendo 3mL de caldo Brain Heart Infusión (BHI) y se incubaron a 37°C por 24 h.; luego se sembraron en placas con agar selectivo Bilis esculina y se incubaron a 37°C por 24-48 h. En los medios para el cepario se incorporó una concentración de vancomicina de 6 µg/mL; para esto se preparó una concentración inicial a partir de 500 mg de *Vancomax* en 10 mL de agua destilada de la cual se obtuvo una solución madre de 50 mg/mL, ésta fue dispensada en viales estériles de 1.5 mL. Se preparó 300 mL de agar semisólido al cual se añadió un volumen de 36 µL de vancomicina en solución.

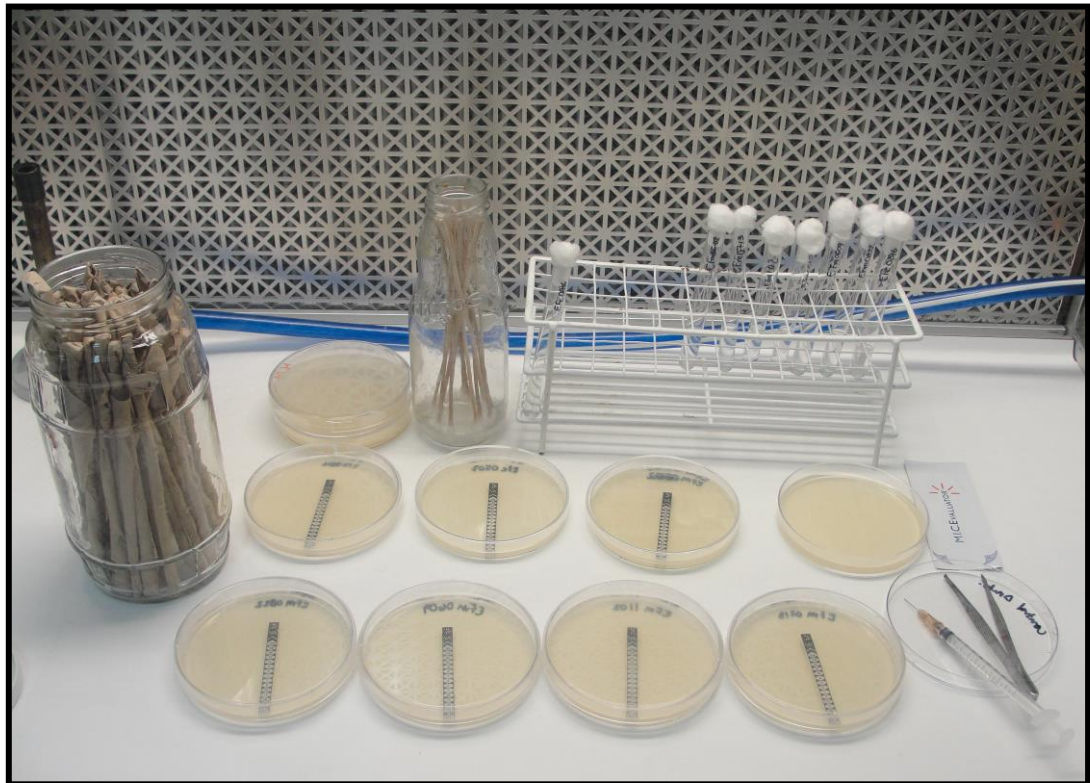
Una vez homogenizado el agar semisólido a temperatura ambiente se procedió a dispensar en viales estériles para el cepario correspondiente. Las cepas con resistencia intermedia se sembraron en agar semisólido con vancomicina [2 µg/mL]. Las cepas de *Enterococcus* fueron sembradas en tubos conteniendo 3mL de caldo Brain Heart Infusión (BHI) y se incubaron a 37°C por 24h. Luego, se resuspendió un inóculo de los caldos y se sembró por estriado en placas de Petri con agar BHI a 37°C por 24h. Se tomaron colonias características de *Enterococcus*, y se sembraron en agar

selectivo Bilis Esculina; se incubó a 37°C por 24 a 48h. Posteriormente, para su mantenimiento, las cepas fueron sembradas en viales conteniendo agar Luria semisólido y en crioviales conteniendo glicerina (50%) para su conservación a temperatura ambiente y a -20°C, respectivamente.

#### **4.3. Determinación del nivel de resistencia a vancomicina**

##### **4.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Se realizó utilizando BHI + 6.5% NaCl. Luego las cepas que presentaron crecimiento fueron sembradas en Agar Bilis Esculina. Se seleccionaron las colonias y se resuspendieron en CINA 0.9% hasta alcanzar el valor de 0.5 en la escala de McFarland (equivalente a  $1 - 4 \times 10^8$  UFC/mL) para luego sembrarlas de acuerdo al método de Kirby Bauer. Luego se utilizó tiras de *E-test* (epsilon test), las cuales registran una escala de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) desde 0.016-256 µg/mL de vancomicina, las tiras fueron colocadas con pinzas y acomodadas con agujas de tuberculina (Fig 6), siguiendo las indicaciones del producto, de manera que la tira quede completamente pegada a la superficie del agar e incubadas a 37°C por 24 h.



**Figura 6. Placas con tiras de E-test (VAN) por cada cepa.** Cada placa de agar Müller Hinton fue diseminada con la cepa correspondiente y colocada encima la tira de E-test (VAN). VAN: vancomicina.

#### 4.4. Determinación de la naturaleza genética de la resistencia

##### 4.4.1. Curación de plásmidos

Se realizó la prueba de curación utilizando SDS (sodio dodecil sulfato) según estandarización realizada por Sumi (2008). Para estandarizar la prueba se utilizó las concentraciones de SDS desde 0.0010% hasta 1% (a partir de una solución stock de 1%) por triplicado en caldo LB y se utilizó las cepas de cada especie para estandarizar (tabla 8), Efm0406 (*Enterococcus faecium*) y Efc0923 (*Enterococcus faecalis*) ambas positivas para ERV, previamente estas cepas fueron reactivadas en 3mL de LB por 24 horas a 37°C; una vez alcanzada la turbidez necesaria se homogenizó en vortex y se utilizó 5µL del caldo para inocular en cada una de las concentraciones de SDS; se incubó a 37°C por 24 horas, luego se

utilizó el método de Kirby Bauer para verificar si las resistencias se pierden o mantienen (Sumi, 2008).

**Tabla 8. Concentraciones de SDS para la curación de plásmidos.** Se estandarizó la concentración de SDS que se utilizó para la curación de plásmidos. Nota: + indica crecimiento en el tubo, - no hubo crecimiento, Efm: *Enterococcus faecium*, Efc: *Enterococcus faecalis*.

[SDS%]	SDS% μL/3mL (LB)	Efm0406	Efc0923
1	3000	-	-
0.1	300	-	-
0.05	150	-	-
0.01	30	-	+
0.005	15	+	+
0.004	12	+	+
0.0035	10.5	+	+
0.0030	9	+	+
0.0025	7.5	+	+
0.0020	6.0	+	+
0.0015	4.5	+	+
0.0010	3.0	+	+

Una vez hallada la concentración ideal de SDS se repitió el mismo procedimiento pero esta vez para cada una de las cepas en estudio. Las cepas que perdieron la resistencia a vancomicina se seleccionaron para la conjugación. Estas se separaron en un medio adecuado como el TSA. Las cepas que no perdieron la resistencia se seleccionaron para el análisis molecular.

#### 4.4.2. Conjugación

Con los datos obtenidos por medio de la curación de plásmidos, las cepas que perdieron la resistencia a vancomicina<sup>r</sup>, fueron utilizadas para la prueba de conjugación. Se utilizaron cepas donadoras ( $\text{Van}^{\text{R}+}$ ) y cepas receptoras ( $\text{Van}^{\text{R}-}$ ), tanto para *Enterococcus faecium* como para *Enterococcus faecalis* (Sumi, 2008).

Se siguió el protocolo descrito por Sumi (2008) para la conjugación de *Enterococcus*. Se utilizó como receptora a la cepa *Enterococcus faecalis* JH2-2 ( $\text{Fus}^{\text{r}}$   $\text{Rif}^{\text{f}}$ ) libre de plásmido. Para ello se sembraron las cepas donadoras en 3mL de caldo BHI + 2 $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina e incubadas a 37°C *overnight* sin aireación. Las cepas receptoras fueron sembradas en 3 mL de caldo BHI + 2 $\mu\text{g/mL}$  de ácido fusídico e incubadas a 37°C *overnight* sin aireación.

Transcurrido este tiempo se procedió a tomar un inóculo (100 $\mu\text{L}$ ) de la cepa donadora y pasarlo a un tubo con 4mL de caldo BHI + 2 $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina; para las cepas receptoras se cogió igualmente un inóculo (100 $\mu\text{L}$ ) en tubos con 8 mL de caldo BHI + 2  $\mu\text{g/mL}$  de ácido fusídico, ambos fueron colocados a temperatura ambiente y aireación hasta que alcanzaron el valor 0.5 en la escala McFarland, entre 4-6 horas. Pasado este tiempo se mezcló en tubos vacíos y estériles 2 mL de cepa donadora y 4 mL de cepa receptora, se dejó a temperatura ambiente *overnight* y sin agitación. Paralelamente, se realizó el recuento de las cepas donadoras en 5 diluciones:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , de estas se trabajaron las 3 últimas, se tomó un inóculo de 100  $\mu\text{L}$  y diseminó en agar BHI + 2  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina y fueron incubadas a 37°C *overnight*.



De los tubos con el cultivo mixto (cepas donadoras y receptoras en conjugación), una vez observada turbidez se interrumpió la conjugación colocando el tubo por 30 segundos en el *vórtex*, luego se tomó una alícuota de 100µL del cultivo mixto y se sembró por diseminación en agar BHI + 2µg/mL de vancomicina + 2µg/mL de ácido fusídico, esto se repitió para cada cepa. Posteriormente las placas fueron colocadas a temperatura ambiente por 24 horas. Finalmente, se realizó el recuento de colonias para determinar la frecuencia de los transconjugantes.

#### **4.5. Identificación de los genes de resistencia a Vancomicina**

##### **4.5.1. Extracción ADN genómico**

Se siguió el método fenol-cloroformo de extracción de ADN genómico desarrollado por Silva (2008). Un cultivo joven se centrifugó a 10 000 rpm/10' y se eliminó el sobrenadante, se lavó en 1mL de Buffer TES (TE 100 X, Sacarosa 250g/L) y centrifugó a 10 000 rpm/10'. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el *pellet* en 300µL TES + 5mg/mL de lisozima e incubó a 37°C por 30'. Luego se adicionó 300µL de una solución de 150 mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8 y 20µL de SDS 40% (p/v) mezclándose hasta que quedó transparente. Seguido se adicionó un volumen de biofenol (fenol: 25, Cloroformo: 24, Alcohol Isoamílico:1), se emulsificó y centrifugó 14 000 rpm por 10 min, se recogió el sobrenadante y se pasó a otro vial; este paso se repitió 2 veces más. Luego la fase superior se traspasó a un vial y se adicionó un volumen de cloroformo, se colocó en el *vórtex*, se emulsificó y centrifugó a 14 000 rpm por 5'. Posteriormente se transfirió la fase superior a otro vial, se adicionó un volumen de isopropanol puro y se mezcló hasta homogenizar y centrifugó a 14 000 rpm por 10'. Luego se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 600µL de etanol

al 70% a 14 000 rpm por 5' y se dejó secar por 15', este paso se repitió dos veces. Finalmente fue resuspendido en 100µL de *buffer* TE y se visualizó en un gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X bajo las siguientes condiciones de corrida: 30 minutos a 75 V<sup>o</sup>, luego fueron revelados con bromuro de etidio por 30 segundos.

#### **4.5.2. Extracción de ADN plasmídico**

Se siguió el método *Boiling Miniprep* descrito por Ausubel (2002). Las cepas fueron incubadas en 5mL de medio CASOY + 2 µg/mL de vancomicina a 37°C por 24 horas. Luego se centrifugó 1.5mL del cultivo por 20 segundos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* en 300µL de *buffer* STET (con 200µg de Lisozima) y se traspasó a un vial de 1.5mL en hielo por espacio de 30" – 10'. Posteriormente se colocaron en agua hirviendo a 100°C de 1'- 2' minutos. Después se microcentrifugó a 13000 rpm x 5'. Se retiró el sobrenadante a un nuevo vial y se añadió 200 µL de isopropanol puro (frío) y se colocó a -20°C por 15' – 30' en hielo y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm x 5 min., se retiró el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* para luego resuspenderlo en 50µL de *Buffer* TE + 1µL de RNasa (10mg/mL).

#### **4.5.3. PCR *multiplex* para genes de resistencia**

Se estandarizó en diferentes condiciones la PCR *multiplex* para los 5 pares de *primers*, ya que sus temperaturas de *melting* variaron desde 57°C (la más baja) hasta 68°C (las más altas).

**Tabla 9. *Primers* para identificación de especie de *Enterococcus***

Especie	Primers	Peso pb
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>ddl<sub>E</sub></i> <i>faecalis</i>	forward, ATCAAGTACAGTTAGTCT reverse, ACGATTCAAAGCTAACTG	941 pb
<i>Enterococcus faecium</i> <i>ddl<sub>E</sub></i> <i>faecium</i>	forward, TAGAGACATTGAATATGCC reverse, TCGAATGTGCTACAATC	550 pb

Fuente: Dutka *et al.*, 1995

**Tabla 10. *Primers* específicos para los genes de resistencia a vancomicina en *Enterococcus***

Genes de resistencia a vancomicina	Primers	Peso pb
<b><i>vanA</i></b>	Forward: AATAGCGCGGACGAATTGGAC. Reverse: AACGCGGCACTGTTTCCCAA	125 pb
<b><i>vanB</i></b>	Forward: CTTAACGCTGCGATAGAAGC. Reverse: CTGATGGATGCGGAAGATAC.	168 pb
<b><i>vanD</i></b>	Forward: TTTGTAAAGCCTGCCCCGTTT. Reverse: CCAAGTAYCCGGTAAATCTTC.	347 pb
<b><i>vanE</i></b>	Forward: AAATAATGCTCCATCAATTTGCTGA. Reverse: ATAGTCGAAAAAGCCATCCACAAG	340 pb
<b><i>vanG</i></b>	Forward: TTGGAGGCAATTCAACAGAGT. Reverse: TCGCAGCCAACAACAGGTATT.	361 pb

Fuente: Domingo *et al.*, 2005.

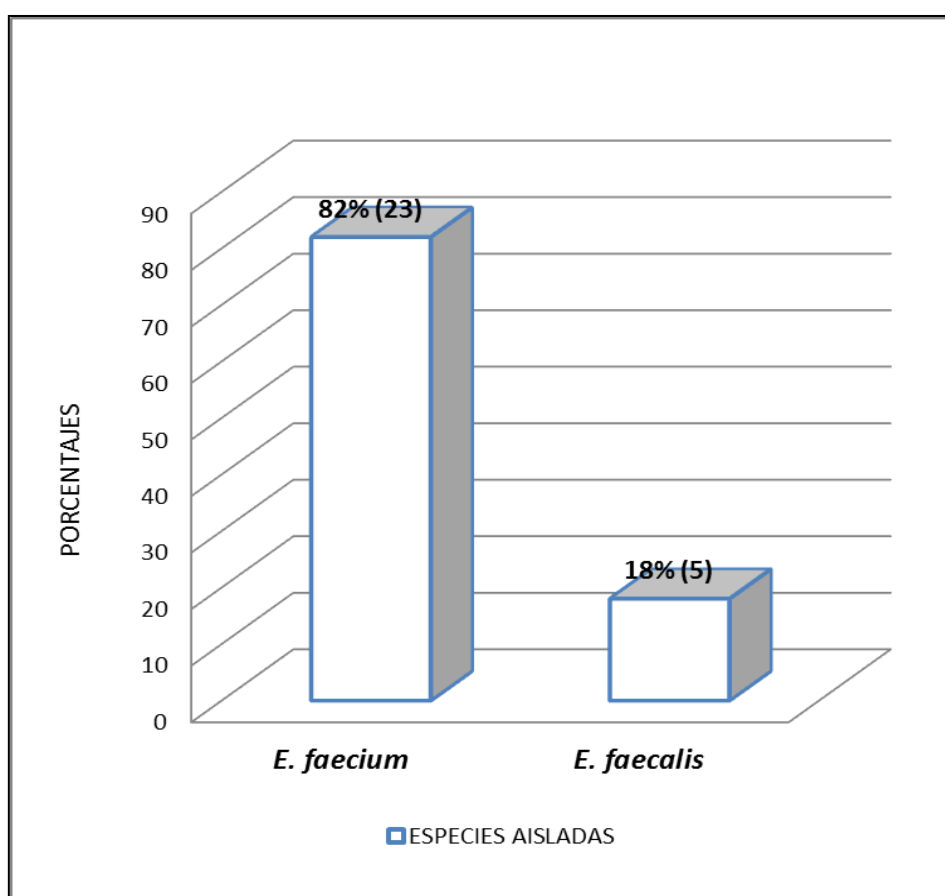
Se estandarizó el *master mix* para la PCR con las siguientes concentraciones para un volumen final de 25 µL, se preparó un *mix* de 50µL: dNTPs (0.2mM), MgSO<sub>4</sub> (1.5mM), Buffer (1X), *primers* (0.25µM) y *Taq* polimerasa (0.02U/µL), considerando que la *Taq* polimerasa utilizada tiene una concentración de 1U/µL, se añadió 1µL del ADN genómico obtenido. El programa que se utilizó para el termociclador fue: desnaturalización inicial por 3 minutos a 95°C y 35 ciclos de amplificación de 20 seg. a 95°C, hibridización 20 seg. a 58°C y extensión a 5 seg. 72°C, extensión final a 72°C por 5 min. y enfriamiento a 4°C por 10 min.

Los amplificados fueron revelados en un gel de agarosa a 2.5% (1.25g en 50mL) para observar la separación ya que los tamaños fueron desde 125pb hasta 300pb aproximadamente (Terreros *et al.*, 2010). Para la amplificación de los genes de especie, la concentración a usar del *mastermix* fue la misma, lo que varió fue el programa que se utilizó en el termociclador siendo: desnaturalización inicial por 3 minutos a 95°C y 35 ciclos de amplificación a 20 seg. a 95°C, hibridización 20 seg. a 48°C y extensión a 15 seg. 70°C, extensión final a 72°C por 5 min. y enfriamiento a 4°C por 10 min.

## V. RESULTADOS

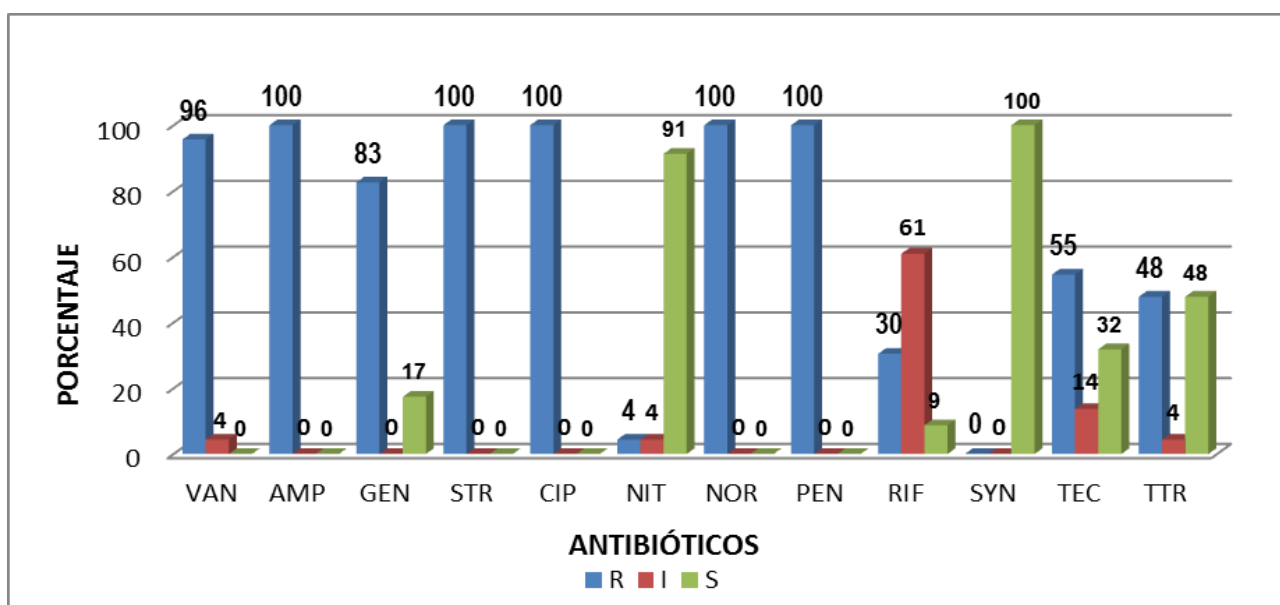
### 5.1. Aislamiento, selección e identificación de cepas

Se seleccionaron un total de 28 cepas de origen intrahospitalario, cada una de las dos especies en mención mostraron características propias que resultaron determinantes para su selección y conservación en la investigación. Un 82% (n = 23) a las especies *E. faecium* y un 18% (n = 5) *E. faecalis* de los diferentes servicios del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen RED-ESSALUD, las cuales fueron utilizadas para los análisis y estudios de la presente investigación (Fig. 7).



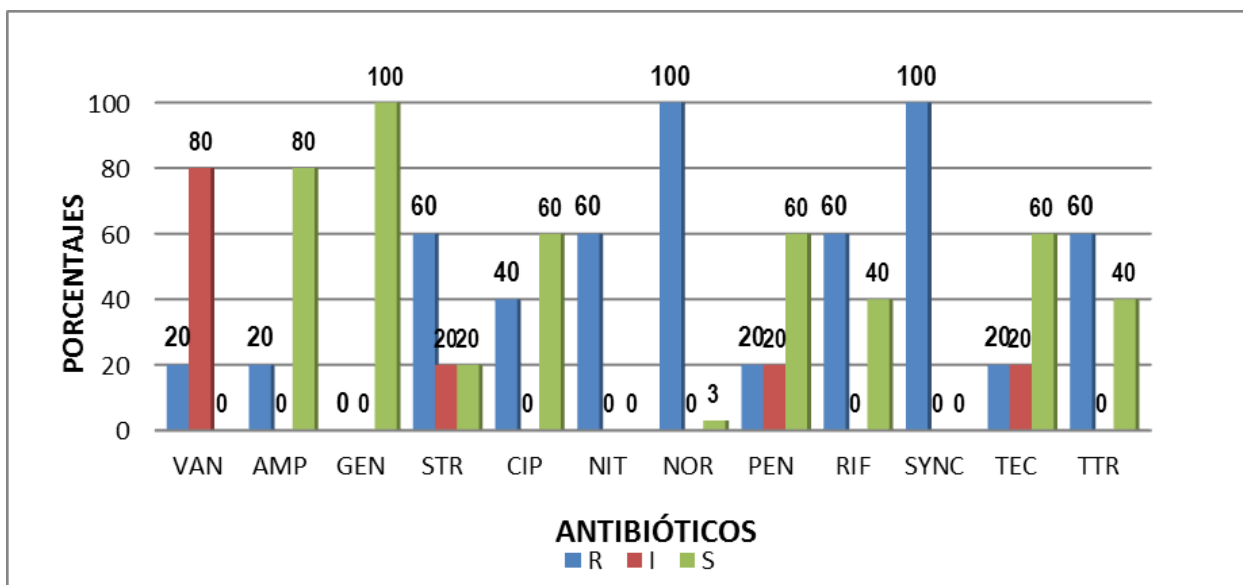
**Figura 7. Porcentajes de especies aisladas para el estudio.** Se encontró que *Enterococcus faecium* fue la especie aislada en mayor porcentaje 82% (n = 23) para la investigación a diferencia de *Enterococcus faecalis* 18% (n = 5).

Del total (28) de cepas aisladas se obtuvo el patrón de susceptibilidad y resistencia a los diferentes antibióticos que se estudian en el laboratorio del Hospital por cada especie (Fig. 8 y 9), también datos sobre la procedencia y origen de las muestras, así como la susceptibilidad antibiótica acumulada de todo el año en el cual se seleccionaron las cepas. Estos datos sirvieron para entender la distribución e impacto de los enterococos vancomicina resistentes dentro del hospital.



**Figura 8. Porcentajes de resistencia y susceptibilidad a antibióticos hallados en *E. faecium*.** Cepas de *E. faecium* seleccionadas en el período de estudio (valores porcentuales). R, I, S, corresponden a la calificación de resistente, intermedio y sensible respectivamente; VAN: vancomicina, AMP: ampicilina, GEN: gentamicina, STR: streptomina, CIP: ciprofloxacina, NIT: nitrofurantoína, NOR: norfloxacina, PEN: penicilina, RIF: rifampicina, SYN: sinerid, TEC: teicoplanina, TTR: tetraciclina.

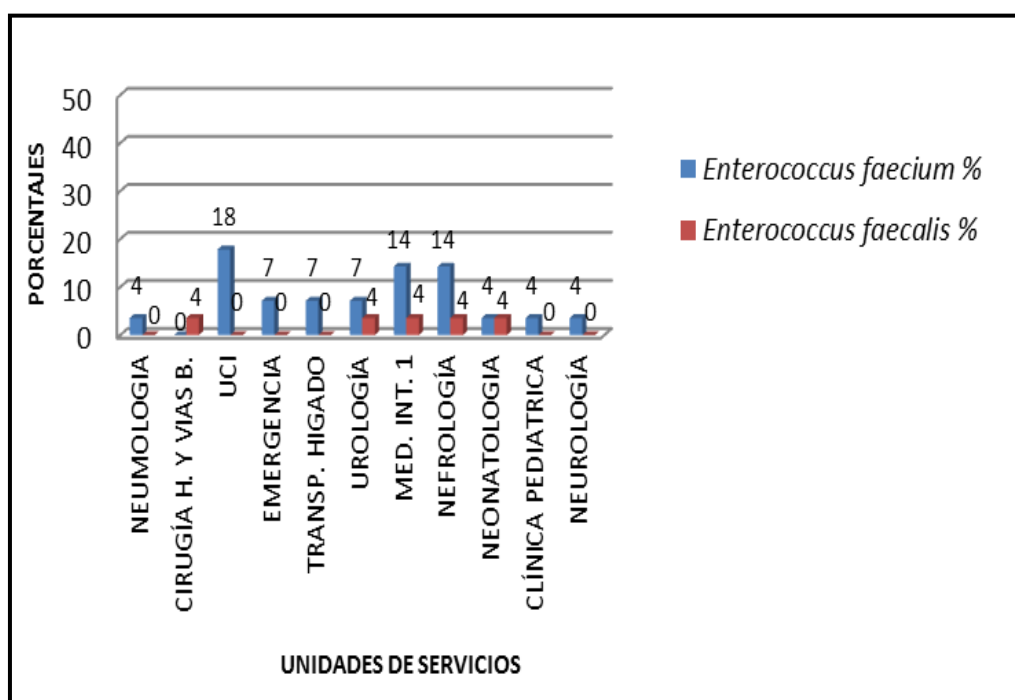
Las cepas seleccionadas de *E. faecium* (n = 23) mostraron mayor resistencia (R) al antibiótico vancomicina (VAN) con valores de 96% (n = 22) y sólo un 4% (n = 1) fueron intermedias (I). También valores altos de resistencia a otros antibióticos como 100% AMP, 83% GEN, 100% STR, y otros a diferencia de lo que sucede con las cepas aisladas de *E. faecalis* (Fig. 9)



**Figura 9. Porcentajes de resistencia y susceptibilidad a antibióticos hallados en *E. faecalis*.** Cepas de *E. faecalis* que fueron seleccionados en el período de estudio (valores porcentuales). R, I, S, corresponden a la calificación de resistente, intermedio y sensible respectivamente; VAN: vancomicina, AMP: ampicilina, GEN: gentamicina, STR: streptomina, CIP: ciprofloxacina, NIT: nitrofurantoína, NOR: norfloxacina, PEN: penicilina, RIF: rifampicina, SYN: synercid, TEC: teicoplanina, TTR: tetraciclina.

Las cepas aisladas de *E. faecalis* (n= 5) mostraron un patrón diferente de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos a diferencia de *E. faecium* (Fig. 8). Los valores hallados para la resistencia a vancomicina fueron de 20% (n = 1), intermedias 80% (n = 4), la susceptibilidad a los demás antibióticos también fue diferente mostrando mayor sensibilidad a los antibióticos ensayados en el hospital.

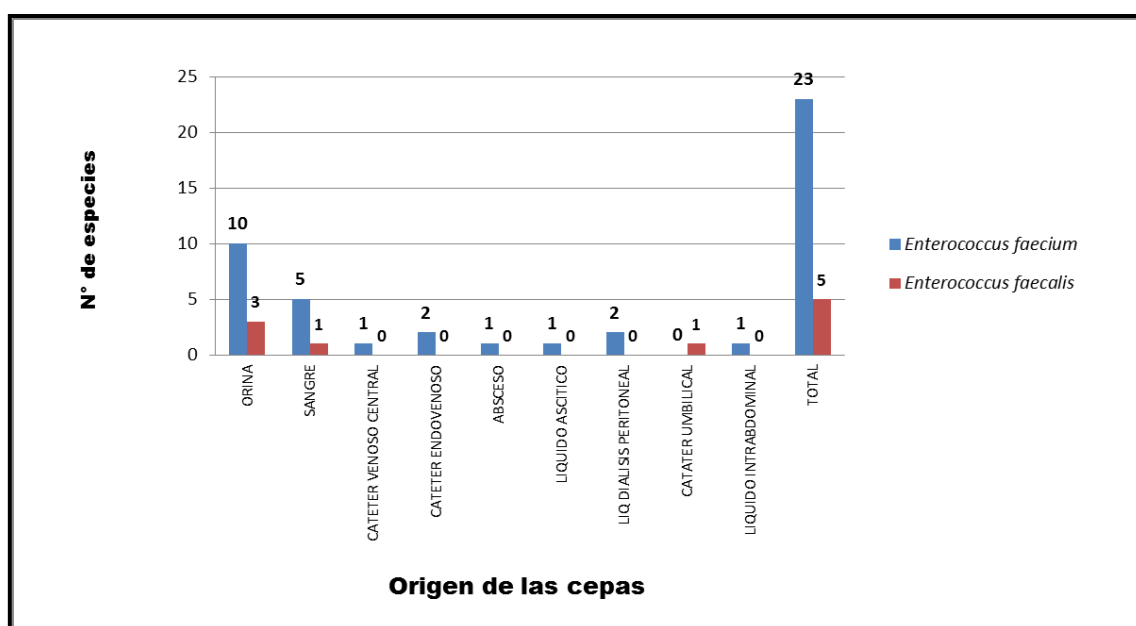
Las cepas seleccionadas también tuvieron otras características como el lugar de procedencia del servicio de la muestra, resultando que la mayoría fueron *Enterococcus faecium* y procedieron del servicio de UCI 18% (n = 5), seguido de Medicina interna I 14% (n = 4) y Nefrología 14% (n = 4). Se encontró que *Enterococcus faecalis* está distribuida en los Servicios de Cirugía de Hígado y Vías Biliares (n = 1), Urología (n= 1), Med. Int. 1 (n = 1), Nefrología (n = 1) y Neonatología (n = 1) de manera equitativa (Figura 10).



**Figura 10. Porcentajes de aislamiento de *Enterococcus* por unidades de servicios.** Se encontró como dato importante que la mayor cantidad de *E. faecium* resistente a vancomicina se ubicó en el servicio de UCI (Unidad de Cuidados Intensivos) 18% (n = 5).



Entre otras de las características relevantes de las cepas seleccionadas se encontró que 13 fueron aisladas de orina, entre ellas *Enterococcus faecium* (n = 10) y *Enterococcus faecalis* (n = 3). Se encontró predominancia de *Enterococcus faecium* (n = 5) en aislados de sangre, cabe mencionar que estas muestras provienen de pacientes que refieren una permanencia prolongada de hospitalización (Figura 11).



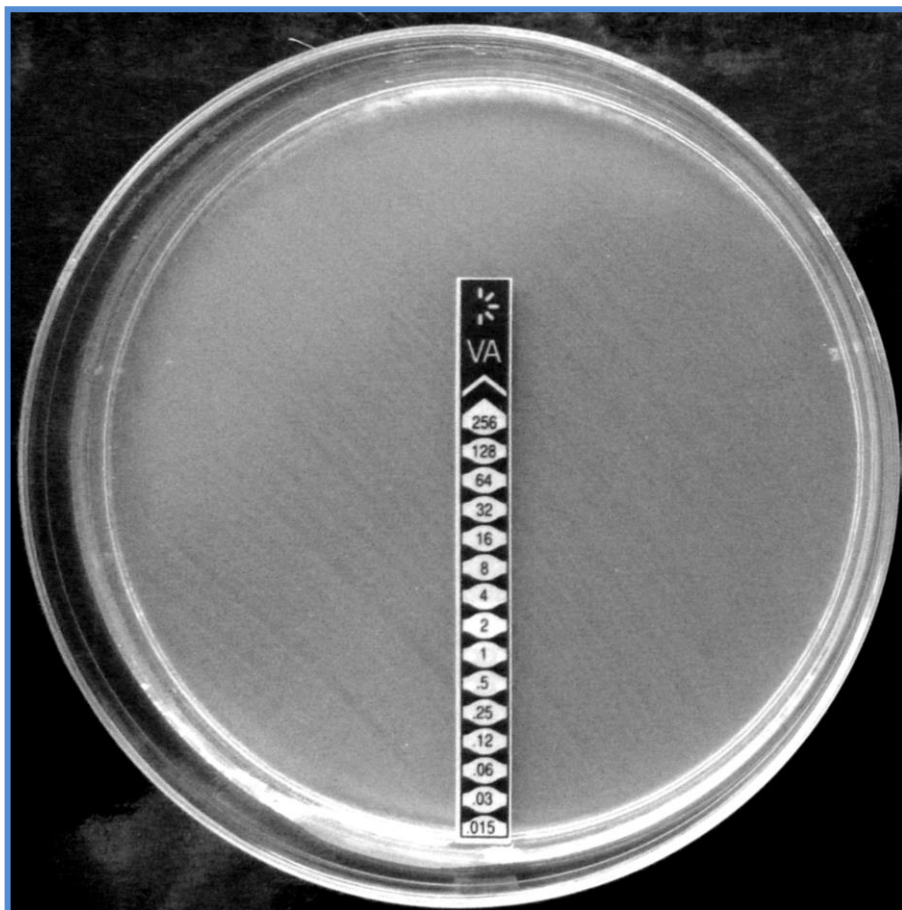
**Figura 11. Número de especies seleccionadas por origen de las cepas.** Las muestras de orina y sangre fueron las más predominantes en los aislamientos seleccionados. La mayor cantidad de especies halladas en las muestras de orina fueron *E. faecium* (n = 10), seguido de *E. faecalis* (n = 3); en las muestras que procedieron de sangre se encontró mayor cantidad de *E. faecium* (n = 5) que de *E. faecalis* (n = 1).

## 5.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante la prueba de E-test

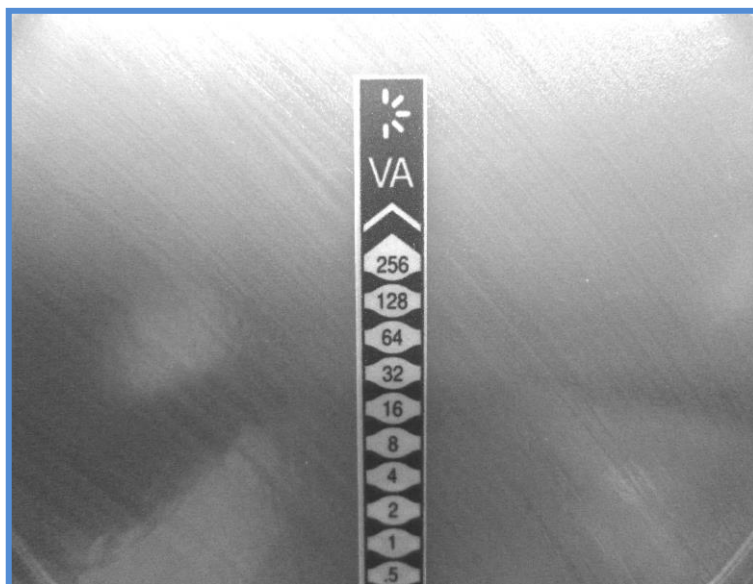
En la Tabla 10 se resume los resultados obtenidos en relación a la resistencia a vancomicina de las cepas seleccionadas, tanto con el sistema *Micro Scan* como por la técnica de la CMI utilizando las tiras de *E-test*. Las cepas que presentaron resistencia intermedia por el *Micro Scan* presentaron un CMI  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  a vancomicina en promedio y además estas cepas presentaron dentro de esos halos pequeñas colonias. Se repitió la técnica del *E-test* comprobando la presencia de estas pequeñas colonias dentro de los halos, según interpretación del CLSI 2013 “*cualquier crecimiento que se pueda discernir dentro de la zona de inhibición se leerá como vancomicina resistente*”. Por ende las colonias que crecieron dentro del halo de inhibición en *Enterococcus faecalis* se consideraron como resistentes (Fig. 13 y 14). Todas las cepas (a excepción de EM2204) de *Enterococcus faecium* resultaron con un CMI  $\geq 256\mu\text{g/mL}$  (Fig 12.a y 12.b), éstas fueron las concentraciones más altas obtenidas para las cepas que se aislaron como se describe en la tabla 11.

**Tabla 11. Datos acumulados de las pruebas realizadas.** La tabla 10 corresponde a una comparación entre los resultados obtenidos luego de realizar la prueba del CMI con las tiras de *E-test* y la lectura del *Micro Scan (MS)*. Las especies de *E. faecium* que mostraron un CMI > 256µg/mL coincidieron con el MS >16µg/mL (ambas resistencias altas) y las cepas de *E. faecalis* con lectura en el MS de 16 (I) – 8(I) µg/mL presentaron colonias pequeñas en los halos de de 2 – 3 µg/mL(\*) (excepto la cepa Efc0824). (\*) La presencia de pequeñas colonias dentro de los halos de inhibición dio como lectura resistente a vancomicina para las cepas de *E. faecalis*.

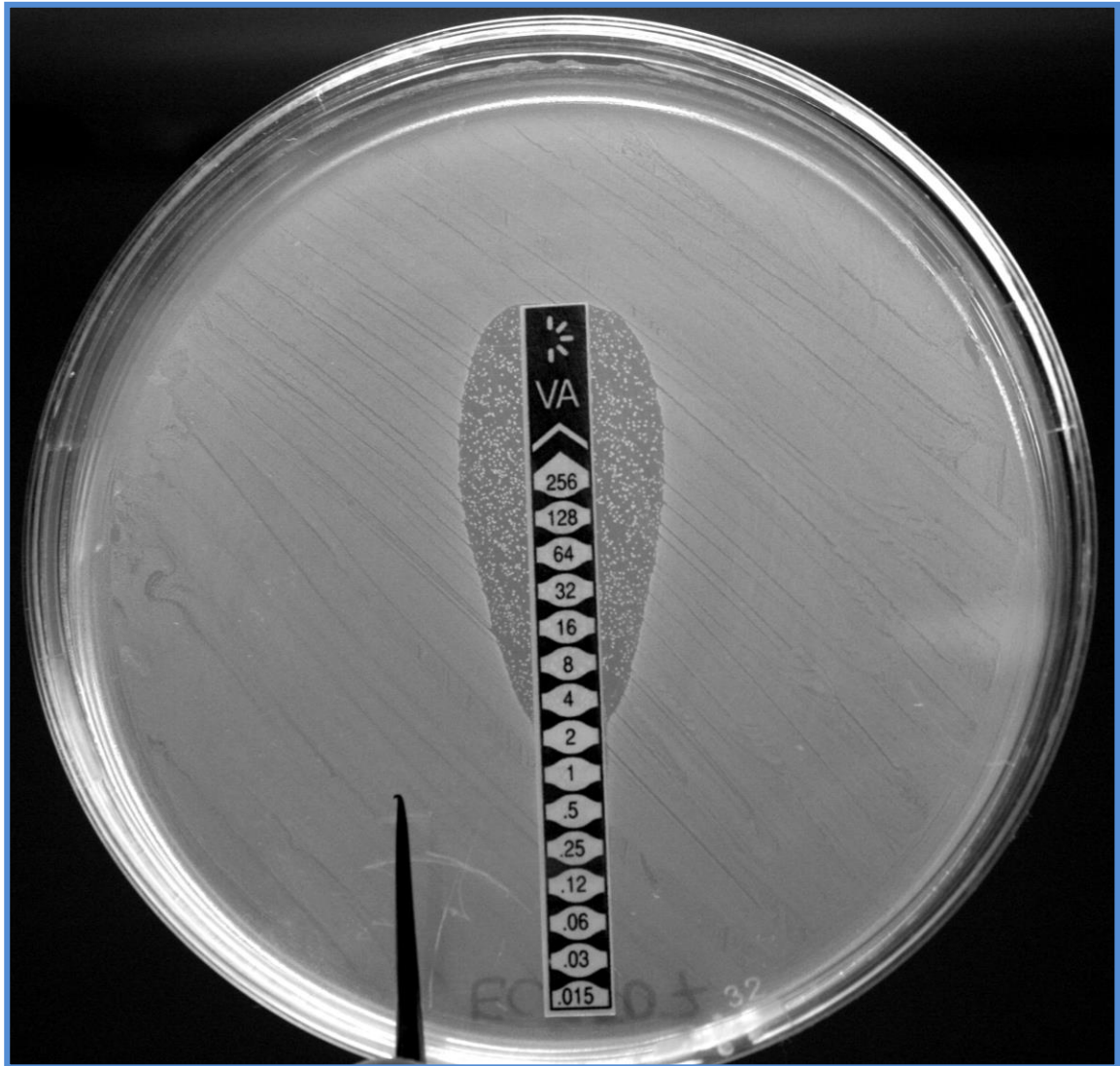
CEPAS	VAN MIC ( <i>MicroScan</i> ®) µg/mL	E-TEST vancomicina (0.015 – 256 µg/mL)
Efm0411	>16 (R)	>256
Efc0507	16 (I)	2 *
Efm0609	>16 (R)	>256
Efm1102	>16 (R)	>256
Efm1313	>16 (R)	>256
Efm2218	>16 (R)	>256
Efm2521	>16 (R)	>256
Efm2708	>16 (R)	>256
Efm2204	16 (I)	2*
Efm2207	>16 (R)	>256
Efm1418	>16 (R)	>256
Efc08016	16 (I)	2*
Efm0923	>16 (R)	>256
Efm1008	>16 (R)	>256
Efm2318	>16 (R)	>256
Efm0713	>16 (R)	>256
Efm2825	>16 (R)	>256
Efm2916	>16 (R)	>256
Efm0212	>16 (R)	>256
Efm2206	>16 (R)	>256
Efc 1609	8 (I)	2*
Efc 1917	8 (I)	3*
Efm1916	>16 (R)	>256
Efm0406	>16 (R)	>256
Efm0602	>16 (R)	>256
Efc 0824	>16 (R)	2*
Efm1818	>16 (R)	>256
Efm0822	>16 (R)	>256



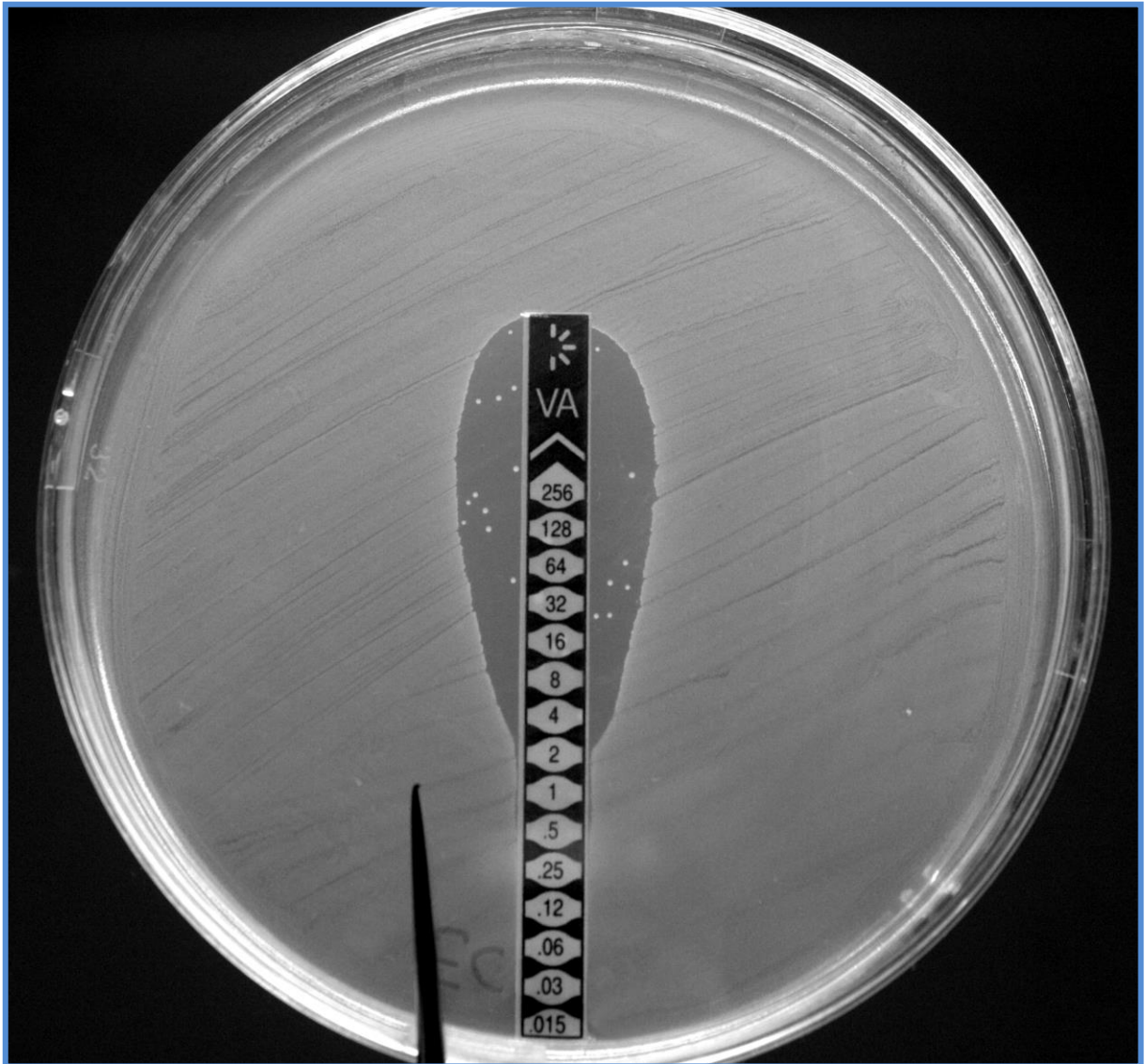
**Figura 12.a. E-test realizado a cepa *Enterococcus faecium* EM0411.** Las 22 cepas mostraron alto grado de resistencia a Vancomicina con una CMI de  $\geq 256\mu\text{g/mL}$ , como se aprecia hay crecimiento alrededor de toda la tira de E-test.



**Figura 12.b. Aproximación del E-test realizado a cepa *Enterococcus faecium* EM0411.** Obsérvese el crecimiento al detalle alrededor de la tira de E-test de vancomicina.

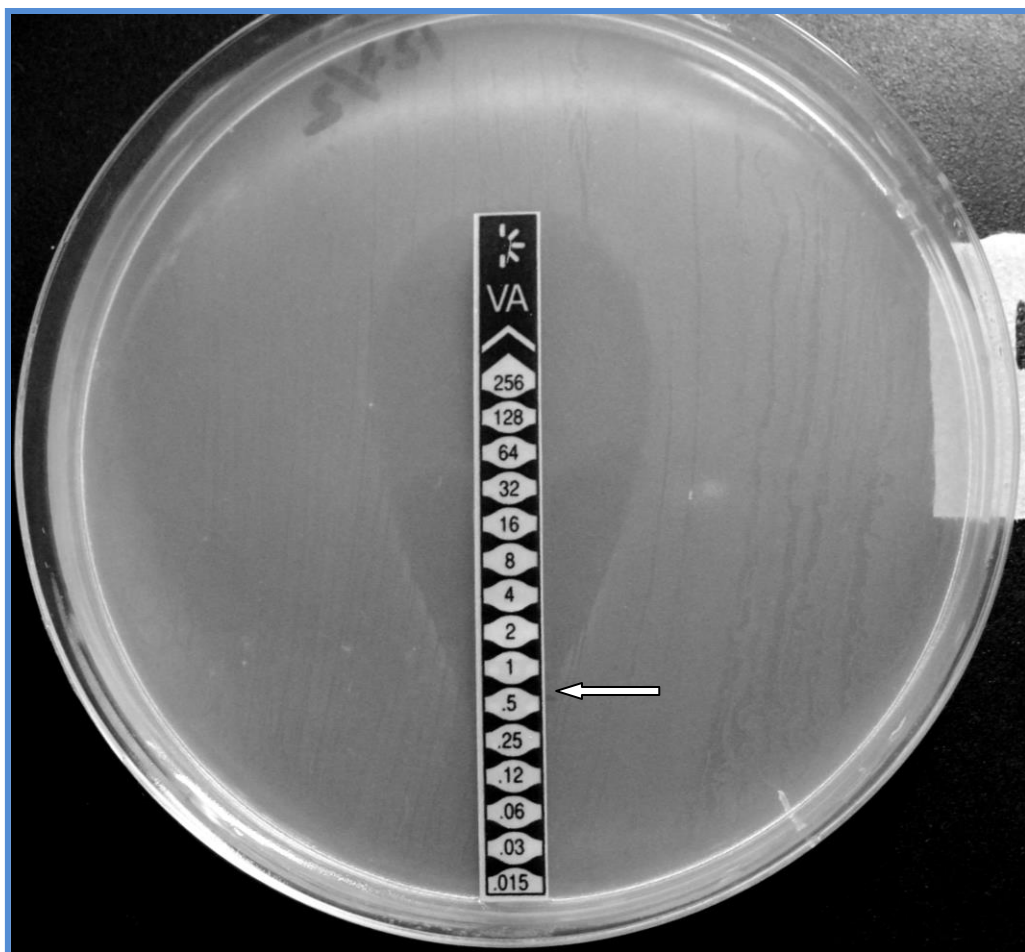


**Figura 13. E-test realizado para cepas *Enterococcus faecalis* EC0507.** Las cepas de *E. faecalis* presentaron crecimiento dentro del halo inhibitorio con una CMI de 2 µg/mL, por normas del CLSI se consideró como resistente. Este crecimiento se consideró como colonias que tienen la característica de heterorresistencia.



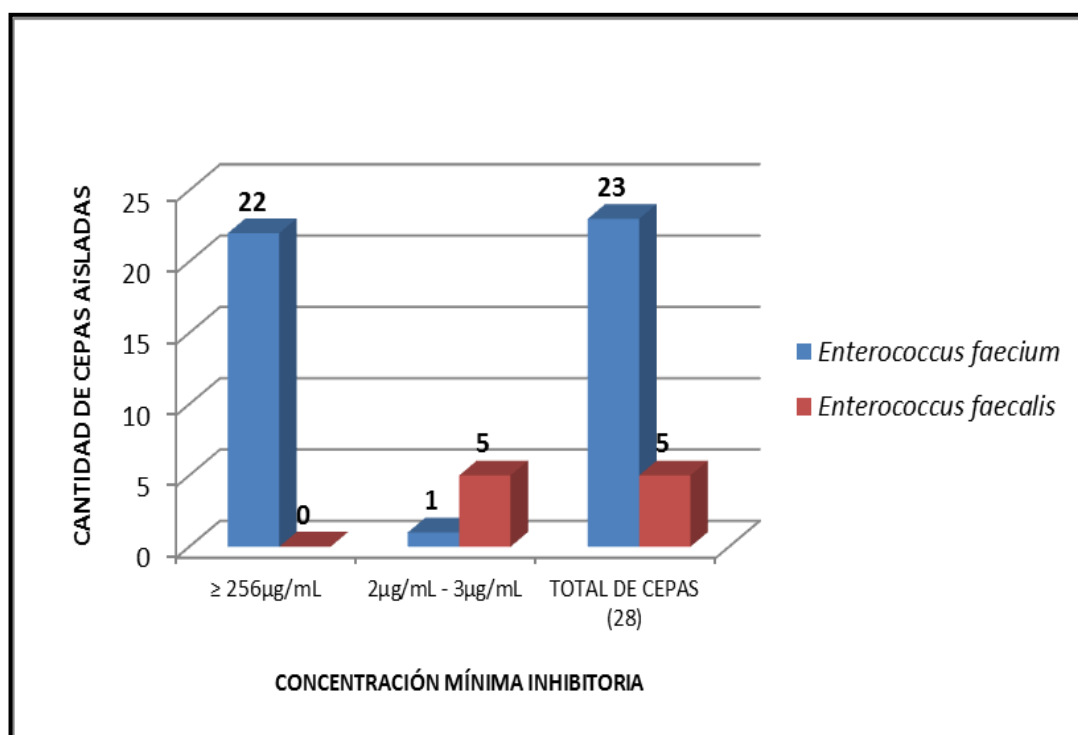
**Figura 14. E-test realizado a cepas *Enterococcus faecalis* EC1609.** Se realizó la prueba del E-test para todas las cepas *E. faecalis* ( $n = 5$ ), obteniéndose las mismas características descritas dentro su halo de inhibición.





**Figura 15. Cepas de *Enterococcus faecium* 127-2 de origen ambiental (Control Negativo).** La flecha blanca indica el valor del halo de inhibición de  $<0.75 \mu\text{g/mL}$  lo que representa una lectura de sensible a vancomicina en el control negativo.

Del total de cepas se obtuvo un 96% (n = 22) que expresaron un CMI  $\geq$  256  $\mu\text{g/mL}$ , todas ellas pertenecientes a la especie *Enterococcus faecium*, a excepción de la cepa Em2204 (4%) que obtuvo un CMI de 2  $\mu\text{g/mL}$  y presentó ligero crecimiento dentro del halo de inhibición. El 100% de las cepas de *Enterococcus faecalis* (n = 5) marcaron un CMI entre 2-3  $\mu\text{g/mL}$  con crecimiento dentro del halo de inhibición, razón por la cual se les consideró como resistente (Figura 16).



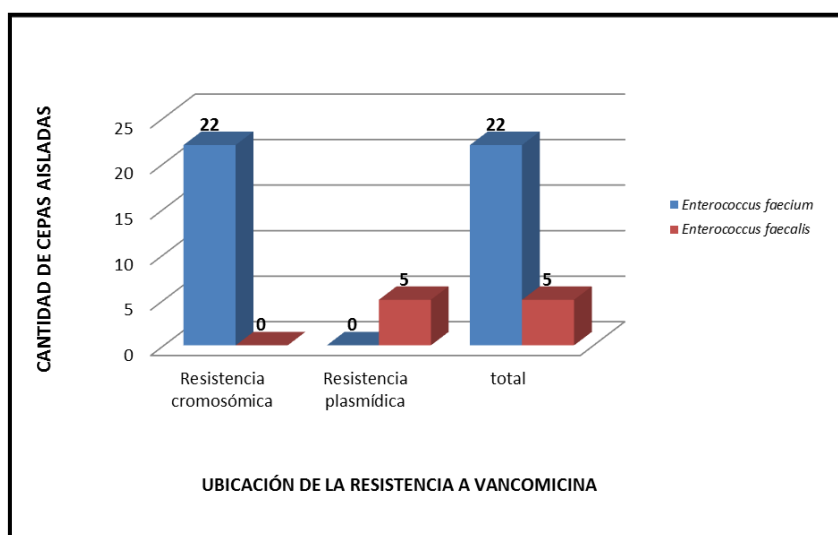
**Figura 16. Valores en la CMI del E-test de las cepas aisladas.** Los valores más altos obtenidos en la CMI del E-test se encontraron en las cepas de *Enterococcus faecium* y fueron  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ , mostrando así una alta resistencia a vancomicina.



### 5.3. Curación de plásmidos

La máxima concentración de crecimiento en LB (Luria Bertani) + SDS (dodecilsulfato sódico) que se estableció para *Enterococcus faecium* fue de 0.005% y para *Enterococcus faecalis* de 0.01%. En la prueba de difusión en disco de Kirby Bauer la lectura de los halos de inhibición mostró un diámetro de 19mm alrededor del disco de vancomicina que se interpretó como sensible según los puntos de corte del CLSI (2013).

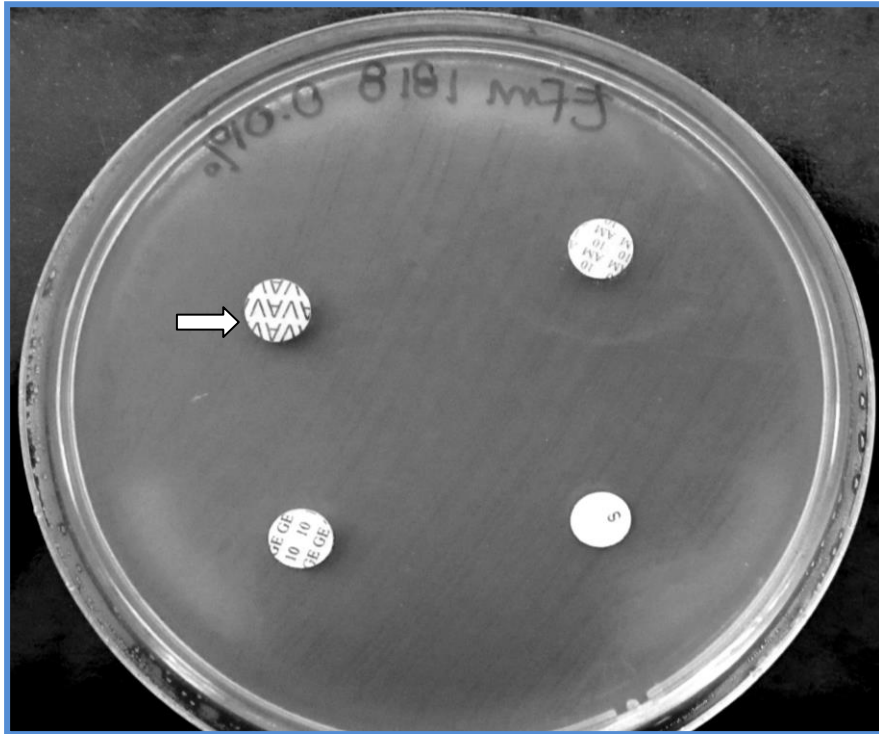
El 96% (22) de las cepas de *Enterococcus faecium* (Fig. 18.a) después de la prueba de curación de plásmidos mantuvo la resistencia la cual fue corroborada luego por el método de Kirby Bauer (Fig. 17), con excepción de la cepa EM2204 que no presentó crecimiento. El 100% de las cepas de *Enterococcus faecalis* presentaron sensibilidad (Fig. 18.b), luego de la prueba de curación de plásmidos, con un halo de 19 mm para el antibiótico vancomicina (30 µg) (Tabla 12).



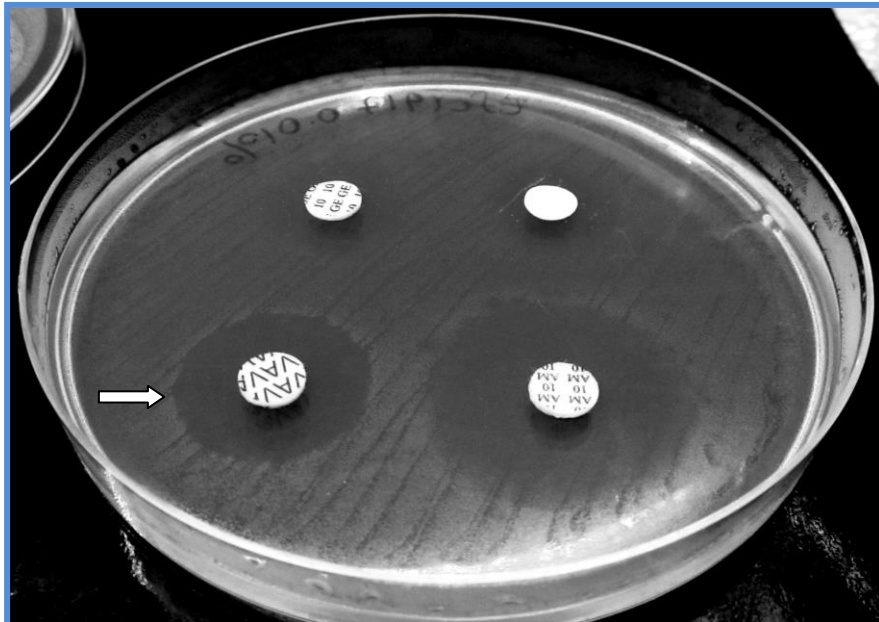
**Figura 17. Cantidad de cepas aisladas y ubicación de la resistencia a vancomicina.** La curación de plásmidos con SDS (0.005-0.01%) mostró que la mayor cantidad de cepas aisladas de *E. faecium* ubicaron la resistencia en el cromosoma y todas las cepas de *E. faecalis* en el plásmido.

**Tabla 12. Ubicación de la resistencia a vancomicina en *Enterococcus* después de la curación con SDS.** De la prueba de curación de plásmidos se obtuvo que 22 de cepas de *Enterococcus faecium* mantuvieron la resistencia (6 mm) luego del curado, ubicando de esta manera su resistencia en el cromosoma y 5 cepas de la especie de *Enterococcus faecalis* perdieron la resistencia mostrando sensibilidad (19 mm), ubicando de esta manera su resistencia en el plásmido. Una cepa no presentó crecimiento (\*). R: resistencia, S: sensible, R: ≤14mm, S: ≥17mm.

CEPAS AISLADAS	Prueba de curación de plásmidos LB +SDS (%)		Ubicación de la resistencia a Vancomicina
	0.005%	0.01%	
Efm0411	R (6mm)	---	Cromosomal
Efc0507	R (10mm)	S (19mm)	Plasmídica
Efm0609	R(6mm)	---	Cromosomal
Efm1102	R(9mm)	---	Cromosomal
Efm1313	R(6mm)	---	Cromosomal
Efm2218	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm2521	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm2708	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm2204	*	*	No hubo crecimiento
Efm2207	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm1418	R(6mm)	---	Cromosomal
Efc0816	I (16 mm)	S (19mm)	Plasmídica
Efm0923	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm1008	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm2318	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm0713	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm2825	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm2916	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm0212	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm2206	R(6mm)	---	Cromosomal
Efc 1609	S (19 mm)	S (18mm)	Plasmídica
Efc 1917	S (17 mm)	S (19 mm)	Plasmídica
Efm1916	R(6mm)	---	Cromosomal
Efm0406	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm0602	R (9mm)	---	Cromosomal
Efc 0824	S (17 mm)	S (19 mm)	Plasmídica
Efm1818	R (6mm)	---	Cromosomal
Efm0822	R (6mm)	---	Cromosomal



**Figura 18.a. Cepas que mantuvieron la resistencia después de la curación de plásmidos con SDS.** *Enterococcus faecium* EM1818 tratado con SDS al 0.01% mantuvo su resistencia a vancomicina (VA) (flecha blanca).



**Figura 18.b. Cepas que perdieron la resistencia después de la curación de plásmidos con SDS.** *Enterococcus faecalis* EC1917 tratado con 0.01% de SDS mostró un halo de 19 mm dando lectura como sensible a vancomicina (VA) (flecha blanca).

#### 5.4. Conjugación

Sobre el control de crecimiento de las cepas donadoras: EC0816, EC1917, EC1609, EC0824, EC0507. Todas presentaron crecimiento en el agar BHI + 2 µg/mL de vancomicina y no crecieron en el agar BHI + 2 µg/mL ácido fusídico. Igualmente la cepa receptora *Enterococcus faecalis* JH2-2 (Fus<sup>r</sup> Rif<sup>r</sup>) libre de plásmido, creció en el agar BHI + 2 µg/mL de ácido fusídico pero no creció en el agar BHI + 2µg/mL vancomicina.

**Tabla 13. Promedio del recuento de cepas donadoras (técnica de conjugación)**

DONADORAS / DILUCIONES	EC0816	EC1917	EC1609	EC0824	EC 0507
$10^{-6}$	1	10	4	11	4
$10^{-5}$	78	56	68	85	95
$10^{-4}$	*972	249	303	302	241

**Tabla 14. Recuento de transconjugantes (técnica de conjugación)**

CONJUGADAS	EC0816	EC1917	EC1609	EC0824	EC0507
RECuento	185	29	9	30	300

**Tabla 15. Frecuencia de transconjugantes**

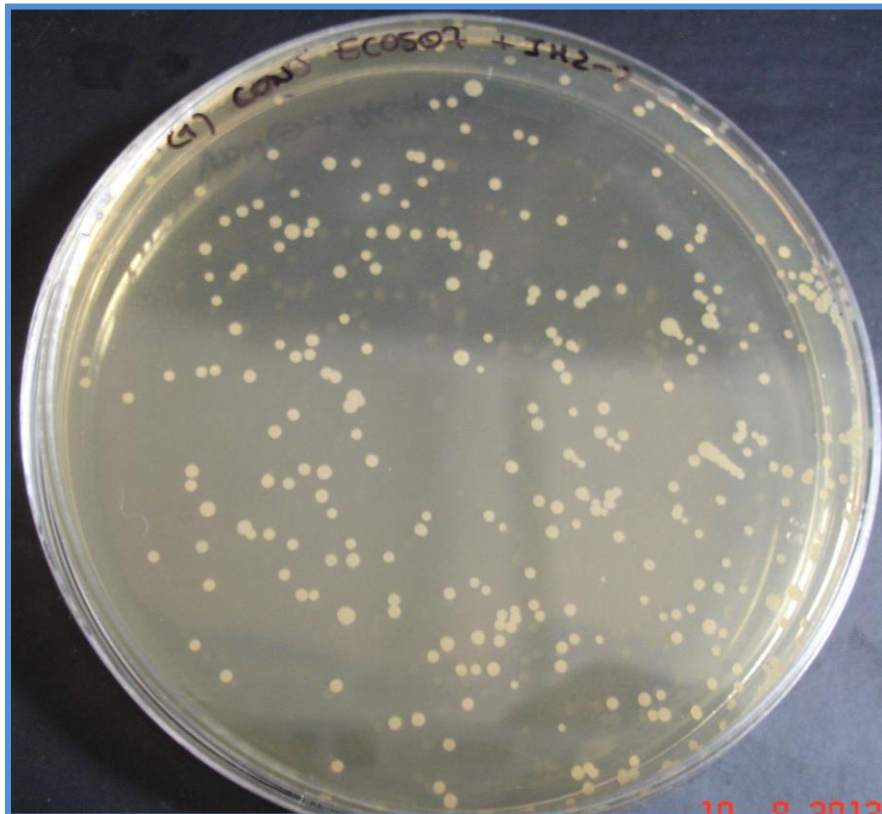
%Frecuencia	EC0816	EC1917	EC1609	EC0824	EC0507
Transconjugantes	0.0023717	0.0035933	0.0000915	0.0002604	0.0050377
	$2.4 \times 10^{-3}$	$3.6 \times 10^{-3}$	$0.9 \times 10^{-5}$	$2.6 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-3}$

Todas las cepas donadoras conjugaron con la cepa receptora, obteniéndose colonias transconjugantes (Fig. 19 y 20). Para el recuento de las cepas donadoras se utilizó tres diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , y se obtuvo del promedio el número de donadoras (Tabla 13). Para el cálculo de la frecuencia de transconjugantes (Tabla 14) se utilizaron las placas cuyo recuento de colonias estuvo dentro del rango de 30-300.

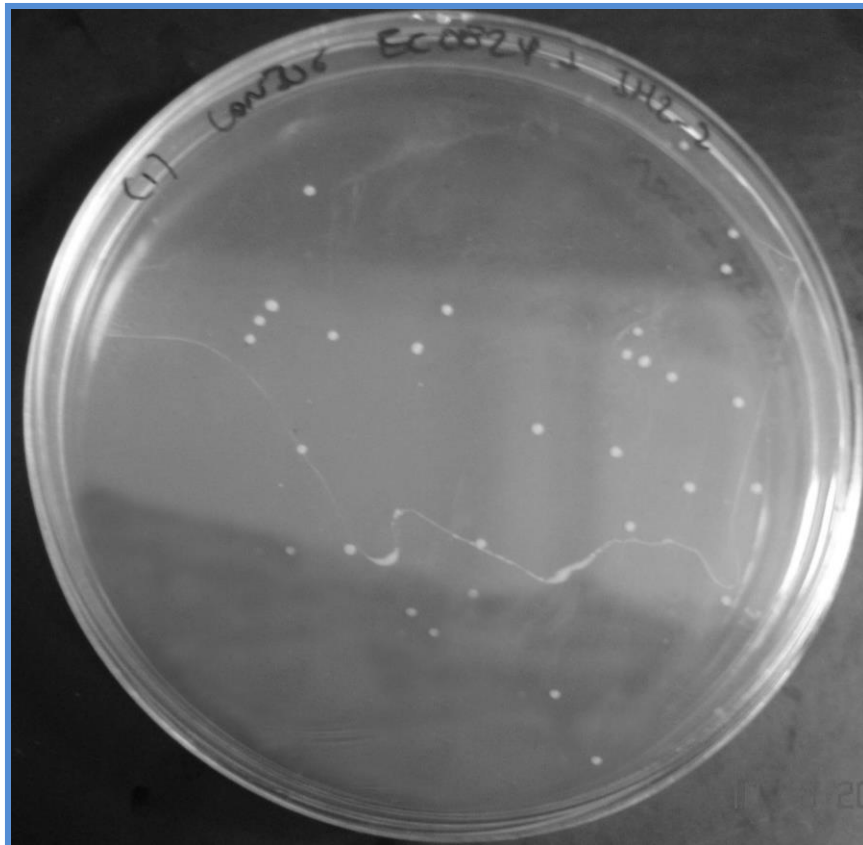
La frecuencia (F) de transconjugantes (Tabla 15) se expresó como el número de transconjugantes que crecen en la placa con los dos antibióticos entre el número total de donantes viables en la mezcla (recuento de donadoras al momento de la conjugación).

$$F = \frac{(\text{TRANSCONJUGANTES} / \text{mL})}{(\text{TOTAL DE N}^{\circ} \text{ DONADORAS} / \text{mL})}$$

El recuento de la receptora (JH2-2) fue de 232 colonias. Las frecuencias resultaron ser desde la más alta, para la cepa EC0507 con  $5 \times 10^{-3}$  hasta la más baja para la cepa EC1609  $0.9 \times 10^{-5}$  transconjugantes por célula donante.



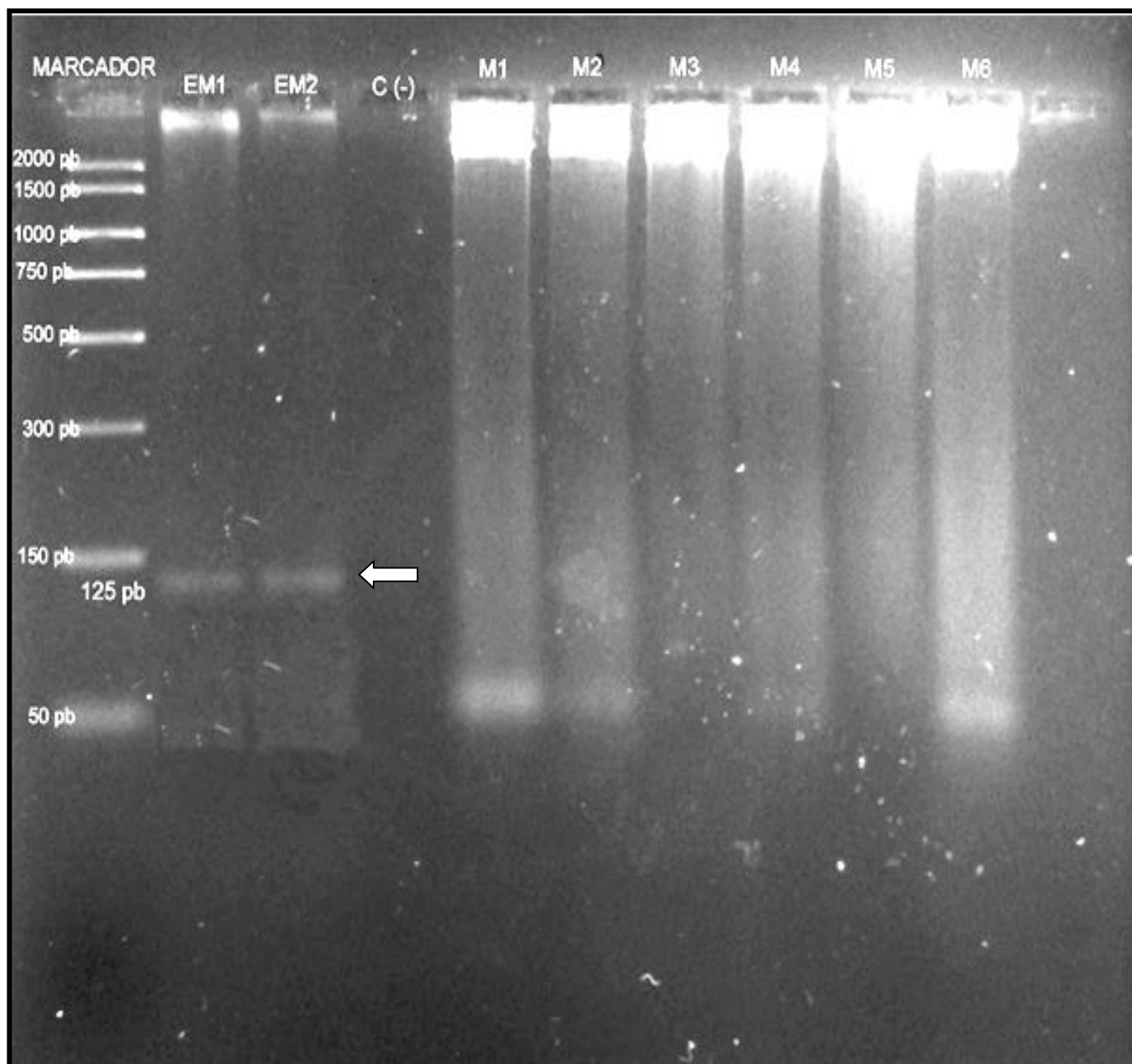
**Figura 19. Cepas transconjugadas EC0507.** EC 0507 + JH2-2, recuento 300 colonias.



**Figura 20. Cepas transconjugadas EC0824.** Recuento de EC0824 + JH2-2, 30 colonias.

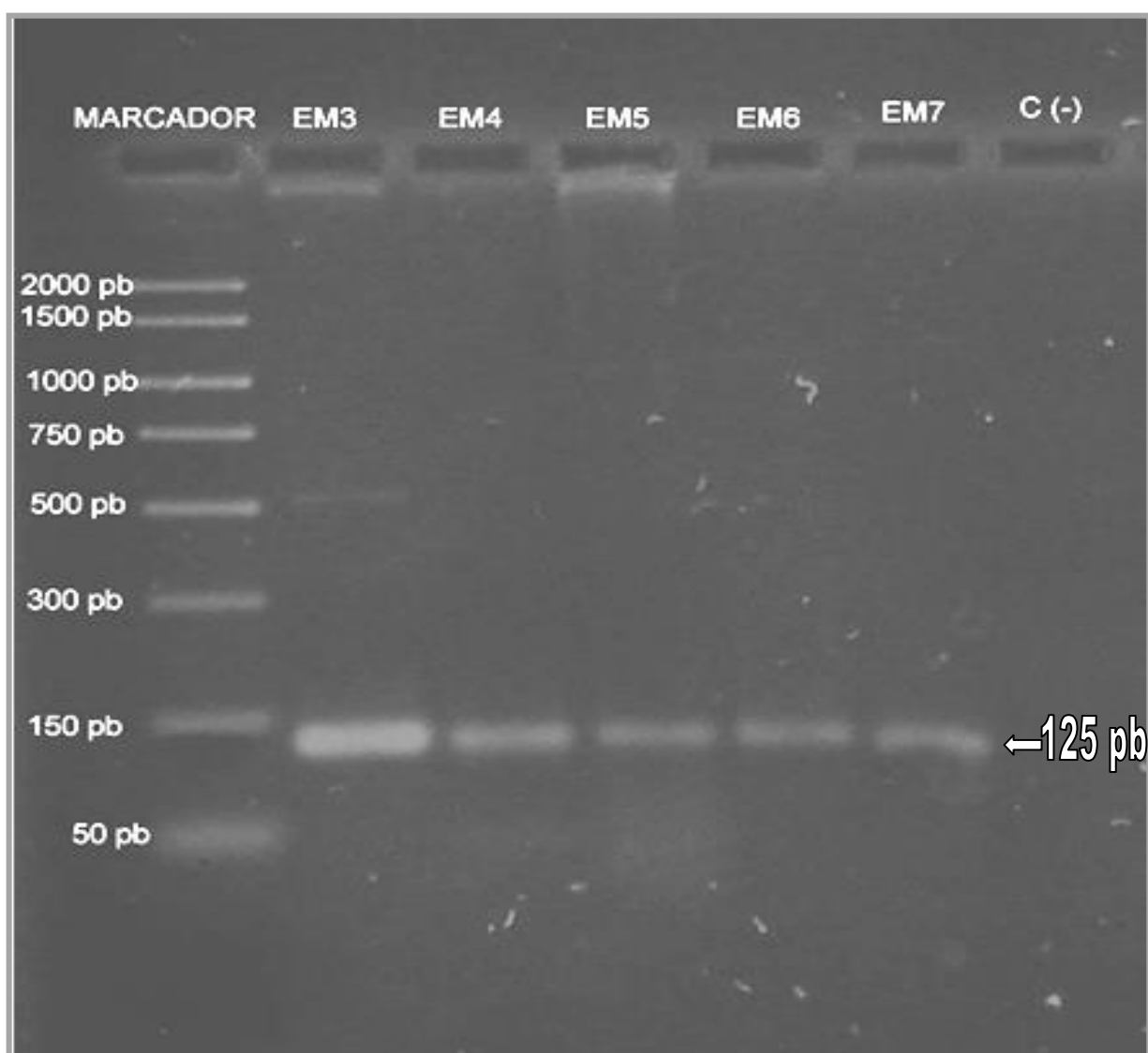
### 5.5. Identificación de los genes de resistencia

Las muestras fueron preparadas en un *buffer* de carga azul de bromofenol 6X y se reveló en bromuro de etidio. Se obtuvo buena calidad de ADN la cual se utilizó para los análisis posteriores.



**Figura 21. Extracción de ADN genómico y amplificados del gen *vanA*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% con voltaje de 75V<sup>o</sup> por 30 min., *buffer* de corrida de 0.5% TAE 0.5 X. Marcador: marcador de peso molecular, EM1: Em0411 y EM2: Em0609 ambos amplificados del gen *vanA* de 125 pb; M1- M6: Em 0411, Em 0609, Em1102, Em1313, Em2218, Em 2521, todas ADN extraído por el método fenol – cloroformo. C (-): control negativo de la PCR para el gen *vanA* (*Enterococcus faecalis* 29212).

Las condiciones de electroforesis para la visualización de los genes de resistencia fueron las mismas que se mencionaron anteriormente, excepto la concentración de la agarosa utilizada que fue de 2.5%, de modo que permita una mejor visualización de los amplicones van y del marcador (Figura 22). Se utilizaron en simultáneo todos los juegos de *primers* descritos en este estudio pero sólo se obtuvo la presencia del gen *vanA* que se identificó por su peso molecular 125pb.



**Figura 22. Amplificación de los genes *van*.** La flecha blanca indica los genes amplificados *vanA* de 125pb de resistencia a vancomicina. Marcador: marcador de peso molecular, EM3 - EM7: Em 0609, Em 1102, Em 1313, Em 2218, Em 2521, todas de la especie *Enterococcus faecium*; C (-): Control Negativo *Enterococcus faecalis* 29212 (sin resistencia a vancomicina), pb: pares de bases, EM: *Enterococcus faecium*.



## VI. DISCUSIÓN

En la actualidad el incremento de los microorganismos resistentes a antibióticos en América Latina ha ido en aumento, sobre todo por el uso indebido de los fármacos y la variabilidad de los microorganismos que les permiten adoptar medidas de supervivencia al medio que los rodea, llámense éstos mecanismos de adquisición de resistencias y de su capacidad innata para almacenar esta información, e inclusive transferirla a otras cepas, lo que determina finalmente el fracaso o éxito terapéutico (Murray, 1990; Sumi *et al.*, 2006; Sumi *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2008; Birgand, 2009; Lata *et al.*, 2009).

Es así como en el presente estudio realizado en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI) se ha reportado la presencia de enterococos resistentes a vancomicina (ERV), siendo predominante la especie *Enterococcus faecium* con 23 cepas (82%), y *Enterococcus faecalis* con 5 cepas (18%) de un total de 28 cepas de ERV aisladas para el presente estudio (Flores, 2007).

Es notable la presencia de ERV en los aislados de muestras biológicas y su distribución en los ambientes del HNGAI, presentándose en mayor frecuencia la especie *Enterococcus faecium* asociada a múltiples resistencias (Conde-Estévez *et al.* 2010), como ampicilina (100%), gentamicina (83%) y estreptomycin (100%) de alta carga. En cuanto a la distribución de los ERV en el hospital se encontró que tuvo mayor presencia en ambientes como, servicios de UCI (18%), Medicina Interna I (14%), Nefrología 14%, y los servicios de Transplante de Hígado (7%), a diferencia de la especie *Enterococcus faecalis* que si bien no cuenta con un amplio rango de resistencias, se la encuentra también en una alta frecuencia como patógeno intrahospitalario (Velázquez, *et al.* 2002, Paz *et al.* 2008; Flores *et al.* 2009), estos datos concuerdan con estudios epidemiológicos realizados en el Hospital Nacional

Edgardo Rebagliati Martins durante los años 2001-2002, en cuanto a la distribución y presencia de ERV de la especie *Enterococcus faecium* diseminada entre sus ambientes hospitalarios (Flores, 2007) y asimismo el origen del aislamiento de *Enterococcus faecium* como agente patogénico asociado mayormente a ITU (Infecciones del tracto urinario) (Echevarría-Zarate *et al.* 2006; Flores, 2007).

Si bien las cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas en este estudio no presentan muchas resistencias, sin embargo existen varios factores de virulencia reportados en asociación a esta especie como: AS (sustancia de agregación), proteína de superficie (Esp), efaA (antígeno A), adhesina Ace (proteínas relacionadas con la adhesión a colágeno en *E. faecalis*), Acm (proteínas relacionadas a la adhesión en la endocarditis en *E. faecium*), además la presencia de la sustancia de agregación (AS) que acentúa su capacidad de conjugar plásmidos lo cual hace a esta especie uno de los agentes etiológicos de bacteremias, endocarditis, infecciones urinarias etc.; así se refleja la diferencia entre *E. faecium* (que mantiene más resistencias a aminoglucósidos y glucopéptidos) y *E. faecalis* (que contiene otros factores de virulencia) (Garza *et al.*, 2002; Díaz-Pérez *et al.* 2010; Quiñones, 2011).

La distribución de estas dos especies en los ambientes nosocomiales es variable dependiendo de la región, mostrando cifras en América Latina de un 2-3%, datos que fueron reportados por primera vez en Sudamérica (en el país de Venezuela), aunque la resistencia fue baja (1%) ésta se mantuvo entre 1988-1994; en el Perú a partir del año 2000 los estudios epidemiológicos realizados en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza ya mostraban datos de una prevalencia de ERV del 3.8%, cifras que como vemos se han incrementado a través del tiempo (Velázquez *et al.*, 2002; Perozo *et al.* 2011). En Europa (Alemania, Grecia, Irlanda, Israel, Eslovenia y Turquía) se ha reportado en los últimos 6 años (antes del 2010) el incremento de brotes de ERV por *E. faecium*, para el año 2012 datos del *Report of the European*

*Antibiotic Resistance Surveillance System 2012* (ECDC, 2012) muestran que las cifras han ido disminuyendo en países como Croacia, Grecia y Eslovenia y que el porcentaje más alto que se reportó fue para Irlanda (44%), las cifras han variado en Europa debido también a las medidas de contingencia establecidas para el uso de la vancomicina (Conde-Estévez *et al.*, 2010; ECDC, 2012).

Resulta importante conocer la distribución de los clones de ERV diseminados por los ambientes hospitalarios debido a que constituyen una causa importante de infecciones asociadas a bacteremias, muchas de ellas causantes de sepsis, infecciones pélvicas e intrabdominales. Las diferentes manifestaciones de la infección por enterococos dependen también del grado de inmunosupresión que presenta el paciente, el tiempo de estancia en el hospital y la exposición prolongada a los antibióticos, sobre todo si la estancia de estos pacientes es a ambientes como UCI, en donde el pronóstico es reservado por la gravedad con la que ingresan los pacientes a dichos ambientes y cuyas condiciones suponen un riesgo para la colonización por enterococos ERV (Salas-Vargas *et al.*, 2004; Bittencourt, 2004; Martínez-Odrizola *et al.*, 2007; Conde-Estévez *et al.* 2010; Perozo *et al.*, 2011).

Los datos generados en la prueba de la CMI realizada por el *E-test* revelaron de forma contundente valores significativos de resistencia a vancomicina tanto para *E. faecium* como *E. faecalis*, estos valores fueron particularmente altos para el caso de las cepas de *E. faecium* ( $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$ ) con la excepción de una cepa Em2204 ( $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ); no obstante para *E. faecalis* se observaron halos de inhibición de  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  con crecimiento dentro de éstos, la presencia de pequeñas colonias que según la interpretación validada por el CLSI (2013), corresponden a la denominación de resistentes. Estas colonias o subpoblaciones que se presentaron dentro del halo o zona de inhibición, son poblaciones que tienen la característica de sobrevivir y ser resistentes al antibiótico (vancomicina), las cuales no siempre son detectables por la

rutina de laboratorio, y tienen la característica de disminuir la actividad antimicrobiana que no queda evidenciada en las pruebas de sensibilidad utilizados rutinariamente (método de Kirby & Bauer), lo cual puede acarrear la persistencia de las bacteremias, recurrencia de la infección y aumento del tiempo de hospitalización (Alam *et al.*, 2001; Aguilar *et al.*, 2009; Morosini *et al.* 2010).

Todas las cepas de *E. faecalis* que se aislaron para el presente estudio mostraron esta característica, y fueron además confirmadas por PCR *múltiplex* como *vanA* positivos, estudios similares en *E. faecium* mostraron igualmente cepas que tenían poblaciones susceptibles a vancomicina, CMI <2µg/mL, presentaban colonias y/o subpoblaciones dentro del halo por el método del *E-test*, que luego fueron confirmadas por PCR como *vanA*, acotando que esta característica de heterorresistencia en enterococos sólo se pudo observar por *E-test* y que es imperceptible por los sistemas automatizados como el *Micro Scan*, esto fue descrito como el primer caso de heterorresistencia para enterococos (Alam *et al.*, 2001).

En nuestro país los puntos de corte que se manejan son del CLSI, pero en otras regiones los puntos de corte pueden variar, esto se da en el caso por ejemplo de la sensibilidad que se da en *Staphylococcus aureus*, siendo así que en la Unión Europea el punto de corte para vancomicina en *S. aureus* es 4mg/L y en EEUU es >32mg/L, de esta forma por ejemplo una cepa con un CMI = 8mg/L sería vancomicina resistente en la Unión Europea y en EEUU sería intermedia (Wootton *et al.*, 2001).

Es importante resaltar que estos CMI representan un valor de inhibición del crecimiento bacteriano sin considerar otras características como las diferentes respuestas que puedan tener las bacterias frente a la actividad que ejerce el antimicrobiano sobre ellos, a esto se suma su capacidad para adquirir diferentes subpoblaciones que resisten a altas concentraciones de los antibióticos. Esto

explicaría por qué las cepas *E. faecalis* aisladas en este estudio arrojan valores como intermedio por el *Micro Scan* y luego presentaron colonias dentro del halo de inhibición en el *E-test* (Morosini *et al.*, 2010). Es probable que en esta búsqueda de cepas que se realizó haya habido más con esta característica, pero como se menciona los sistemas automatizados no son lo más indicados para detectar este fenómeno, ya que al parecer es más común encontrar resistencia pura o sensibilidad totalmente disminuida, habiendo sido éste el primer tamizaje de selección que utilizamos para la colección de cepas ERV del HNGAI (Srinivasan *et al.*, 2002).

En cuanto a los resultados de 'curación de plásmidos', se obtuvo que las cepas que presentaron este fenómeno de heterorresistencia (todas las *E. faecalis*) perdieron esa capacidad y pasaron a ser sensibles, al contrario de lo que sucedió con las *E. faecium* ( $\geq 256$  µg/mL) que mantuvieron la resistencia después del tratamiento con el detergente, el tratamiento de curado de plásmidos permitió revelar si la resistencia a vancomicina hallada en estas cepas tanto para *E. faecium* como *E. faecalis* se encontraban albergadas en el plásmido o en el cromosoma, la cantidad en porcentaje de SDS que se necesitó para el curado de estas cepas fue de 0.01%, otros estudios de aislados clínicos indicaron cantidades más altas como 0.1% necesario para *E. faecalis* (Keyhani *et al.*, 2006) y hasta 2% de SDS para cepas clínicas provenientes de afecciones urinarias (Ahmad *et al.*, 2004), y en cuanto a cepas ambientales se señala que sólo es necesario 0.003% de SDS para *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* (Sumi, 2008).

De las 23 cepas en estudio, sólo 5 perdieron la resistencia y se obtuvieron halos de inhibición de 19 mm (todas *E. faecalis*), mostrando ser sensibles después del curado con SDS al 0.01%, interpretando de esta manera el origen de su resistencia como plasmídica, en tanto para las cepas que no perdieron la resistencia (*E. faecium*) se interpretó la resistencia como de origen cromosomal.

De las cepas que perdieron la resistencia, éstas fueron utilizadas para probar si el plásmido que tiene la resistencia a vancomicina es transmisible por conjugación o no. La cepa utilizada como receptora fue *Enterococcus faecalis* JH2-2 (Fus<sup>r</sup> Rif<sup>r</sup>), las donadoras fueron las 5 cepas de *E. faecalis* que perdieron la resistencia utilizando SDS en el curado. En esta prueba, de todas las cepas *E. faecalis*, EC0816, EC 1917, EC1609, EC0824, EC0507, se obtuvieron transconjugantes, la cepa que mostró el índice más alto de transconjugación fue EC0507 con  $5 \times 10^{-3}$ . Estos datos obtenidos son similares a los estudios de transferencia de *vanA* realizados por Tomita *et al.*, (2003) en la que se indican valores de transferencia de  $10^{-5}$  por célula donadora (en cepas clínicas), otros datos de transferencia se reportaron en aislados provenientes de bilis con frecuencias de  $1 \times 10^{-3}$  y en aislados de heces con frecuencias de transferencias de  $6 \times 10^{-5}$  (Paoletti *et al.*, 2007). La frecuencia de transferencia en cambio, cuando se trata de cepas ambientales, para enterococos es distinta siendo de  $9 \times 10^{-6}$  hasta  $1 \times 10^{-1}$  (resistencia de estreptomicina y eritromicina, pero no se reportan para vancomicina) (Sumi, 2008). Estos datos indican que existe una frecuencia significativa de transferibilidad de la resistencia a vancomicina en las cepas de *Enterococcus faecalis* que se utilizó para la conjugación y por ende la posibilidad de transferir estas resistencias a otros enterococos y especies no enterocócicas que sean sensibles a la vancomicina (Ligozzi *et al.*, 1998; Tomita *et al.*, 2003; Kajiura *et al.*, 2006; Paoletti *et al.*, 2007; Wardal *et al.* 2010).

Las 28 cepas aisladas para este estudio revelaron en el análisis de PCR múltiple la presencia del gen *vanA*. El gen *vanA* se ha reportado, entre otros, en un transposón llamado *Tn1546*, éste tiene la característica de poder ubicarse en el cromosoma o en el plásmido, el genotipo de resistencia *vanA* es el que mayormente se encuentra distribuido en Latinoamérica (Domingo, 2007; Terreros, 2009; Sujatha, *et al.* 2012; Santos-Beneit *et al.*, 2014). El transposón *Tn1546* que lleva el operón del gen

*vanA* encargado de la codificación para la resistencia a glucopéptidos también ha sido encontrado en otras especies diferentes a enterococos, como *Bacillus cirulans*, aunque la mayoría de Gram positivos son susceptibles a los glucopéptidos existen algunos patógenos oportunistas como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus flavescens* que portan de manera intrínseca esta resistencia (Ligozzi *et al.*, 1998). La transferencia de estos elementos genéticos móviles se da entre enterococos susceptibles y algunas especies no enterocócicas como: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus*, y *Listeria*, es rara la propagación natural entre especies no enterocócicas pero sí ha sido señalado en muestras clínicas (Ligozzi *et al.*, 1998; Mendez-Alvarez *et al* 2000; D'Costa *et al.* 2011; Santos-Beneit. *et al.*, 2014).

A diferencia de los genotipos encontrados en otros autores, en las 23 cepas analizadas molecularmente no se encontró ningún positivo para *vanB*, *vanD*, *vanG* y *vanE*, tampoco se encontró cepas que compartieran uno o más genes de resistencia a vancomicina, como si ha sido reportado por Domingo *et al.*, 2005, en el cual se ha mencionan hasta cepas con 3 juegos de genes para resistencia a vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanD*) (Domingo, *et al.* 2005).

Es importante resaltar que gracias a las herramientas moleculares en el presente estudio se obtuvieron resultados que permitirán comprender mejor el comportamiento de los enterococos clínicos, lo que permite complementar los métodos de laboratorio utilizados para el diagnóstico, así también brinda información sobre la presencia de genes *vanA* de resistencia a vancomicina que son transferibles y que existen evidencias de la presencia de subpoblaciones (heterorresistentes), que están en constante cambio y adaptación generada por la presión selectiva de los fármacos administrados en los hospitales, llegando a hacerse más estables causando

bacteremias frecuentes y con ello hasta la muerte del paciente (fallo terapéutico) si es que no se llega a detectar a tiempo, situación que se agrava si se trata de pacientes de alto riesgo como transplantados, provenientes de servicios de UCI o pacientes oncológicos. Finalmente, la incorporación de los métodos moleculares, podría facilitar la rapidez y especificidad con la que se podría realizar un mejor diagnóstico clínico y evitar así la presión selectiva sobre los enterococos, la diseminación de sus genes de resistencia a vancomicina en los ambientes hospitalarios y la posibilidad de transferencia a otras especies no enterocócicas como son los estafilococos. (Ligozzi *et al.*, 1998; Salas-Vargas *et al.*, 2004; Kajiura *et al.*, 2006; Bittencourt & Suzart, 2004; Martínez-Odrizola *et al.*, 2007; Wardal *et al.* 2010; Conde-Estévez *et al.* 2010; D'Costa *et al.* 2011; Perozo *et al.*, 2011; Santos-Beneit *et al.*, 2014).



## VII. CONCLUSIONES

- 7.1. Se encontraron cepas vancomicina resistentes provenientes de diferentes muestras del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.
- 7.2. Se determinó el nivel de resistencia a vancomicina mediante la Concentración Mínima Inhibitoria por el método del Epsilon test (*E-test*), obteniéndose valores altos en 23 cepas de *Enterococcus faecium*  $\geq 256\mu\text{g/mL}$ ; y 5 *Enterococcus faecalis* que mostraron subpoblaciones heterorresistentes a vancomicina dentro del halo de inhibición.
- 7.3. Se halló que la resistencia a vancomicina estuvo ubicada en el cromosoma para 23 cepas de *Enterococcus faecium* y en el plásmido para 5 cepas de *Enterococcus faecalis*.
- 7.4. En las 28 cepas estudiadas se detectó la presencia del gen *vanA* de resistencia a vancomicina.
- 7.5. Se obtuvieron cepas transconjugantes de *Enterococcus faecalis*, siendo la frecuencia más alta para la cepa EC0507 con  $5 \times 10^{-3}$ .
- 7.6. Los plásmidos conjugativos del genotipo *vanA* son responsables de la transferencia de la resistencia a vancomicina dentro de los ambientes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.

## VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1.** En el Perú se necesita realizar estudios más amplios en cuanto a la epidemiología de hospitales de nivel III e implementar de manera complementaria el diagnóstico de este tipo de resistencias o fenómenos de heterorresistencias que muchas veces pasa desapercibido para la rutina de laboratorio y no son detectables por los sistemas automatizados.
- 8.2.** El *E-test* puede ser una herramienta que deje al descubierto este tipo de comportamientos pero se sabe que no se incorpora por su alto costo. Para salvar esta situación, se podría empezar por discernir qué pacientes son de alto riesgo y complementar un estudio más profundo en cuanto se perciba pacientes con bacteriemias y/o estancias prolongadas en ambientes UCI. Para ello es necesario también contar con un estudio que vaya de la mano con el diagnóstico del clínico.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADÍA P. Lorena, Chippaux M. Silencing of Glycopeptide Resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405 by Novobiocin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, Vol. 49, No.4, p. 1419-1425.
- AGUILAR, Lorenzo; GIMÉNEZ, María José; BARBERÁN, José. Heterorresistencia y tolerancia a glucopéptidos en aislados grampositivos en el hospital: ¿fenómenos "invisibles" para el clínico con posible traducción clínica?. *Revista Española de Quimioterapia*, 2009, vol. 22, No 4, p. 173-179.
- AHMAD, SAMIA; IQBAL, A.; RASOOL, S. A. Isolation and biochemical characterization of enterocin ESF 100 produced by *Enterococcus faecalis* ESF 100 isolated from a patient suffering from urinary tract infection. *Pakistan Journal of Botany*, 2004, vol. 36, no 1, p. 145-158.
- ALAM, M. Rabiul, et al. Heteroresistance to Vancomycin in *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology*, 2001, vol. 39, no 9, p. 3379-3381.
- AMAURY Nuez Betancourt, Candido Morales Rodriguez, Maria Rivera Martinez, Angel Gonzalez Gonzalez. Vancomicina. Un vencedor vencido. *MEDICRIT Revista de Medicina Interna y Medicina Crítica*. Vol. 3 Nº 6. 2006, p: 136-138.
- ANDERSON, John F, Torrey D Parrish, Mastura Akhtar, Ludek Zurek, and Helmut Hirt. 2008. Antibiotic Resistance of Enterococci in American Bison (Bison Bison) from a Nature Preserve Compared to That of Enterococci in Pastured Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 74, nº 6, p: 1726–30.
- ARTHUR Michael & COURVALIN Patrice. Genetics and Mechanisms of Glycopeptide Resistance in Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993. Vol. 37, No. 8, p. 1563-1571.
- AUSUBEL, F. M., et al. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Hoboken. 2002.

- AYATS ARDITE Josefina. Resistencia a la Vancomicina en el género *Enterococcus*. Servicio de Microbiología. C.S.U. de Bellvitge. Hospital de Llobregat. Barcelona 2003.
- BAZET CRISTINA, Blanco J., Seija V., Palacio R. Enterococos resistentes a Vancomicina. Un problema emergente en Uruguay. *Revista Médica Uruguay*. 2005. Vol 21, p. 151-158.
- BELL Jan M., Paton James C., Turnidge John. Emergence of Vancomycin Resistant Enterococci in Australia: Phenotypic and Genotypic Characteristics of Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998. Vol 36, N-8, p. 2187-2190.
- BILLSTRÖM, Hanna. Molecular epidemiology of clinical *Enterococcus faecium*. Institutionen för laboratorie medicin. Department of Laboratory Medicine, 2008. Disponible en <<http://publications.ki.se/xmlui/handle/10616/39422>>.
- BIRGAND G. Glycopeptide resistant enterococci: What's the problem?. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2009. N° 20, p. 248 – 250.
- BITTENCOURT DE MARQUES, Elisa; SUZART, Sérgio. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *Journal of medical microbiology*, 2004, vol. 53, no 11, p. 1069-1073.
- BOYD, David A., Du, T., Hizon, R., Kaplen, B., Murphy, T., Tyler, S. et al. VanG-type Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, vol. 50, no 6, p. 2217-2221.
- CDC. Nosocomial enterococci resistant to Vancomycin United States 1989–1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1993, Vol 42, p:597–599.
- CETINKAYA Yesim., Falk P., Mayhall. CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000. Vol 13, p: 686–707.
- CHRYSTAL Juliet L. Estudio de susceptibilidad *in Vitro* de *Enterococcus spp*. *Revista de Chile de Infectología* 2002; Vol 19, Supl. 2, p: 111-115.

- CLAEISSON Carina. Staphylococci and Enterococci, Studies on activity of antimicrobial agents and detection of genes involved in biofilm formation, 2010. Linköping University, Sweden. *Linköping University Medical Dissertations*. 1993, Nº. 1187, p. 41.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement; M100-S20. Laboratory Standards Institute 2013. Wayne. PA.
- CONDE-ESTÉVEZ, David, Sorli, L., Morales-Molina, J. A., Knobel, H., Terradas, R., Mateu-de Antonio, J., & Grau, S. Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2010, vol. 28, no 6, p. 342-348.
- COURVALIN Patrice. Resistance of Enterococci to Glycopeptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 34, Nº 12. Dec. 1990, p. 2291-2296.
- COURVALIN P. Vancomycin-Resistant Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 2006. Vol 42, Suplemento 25-34.
- CRYLE Max. P450-catalysed glycopeptide biosynthesis. *Biotechnology and Life Sciences in Baden-Württemberg*. 2014. <<http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/groups/cytochrome/glykopeptide>>.
- D'COSTA V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debuyne R., Golding B., Poinar H., Wright G. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011. Vol 477, p. 457-461.
- DALLA COSTA, Libera; Souza, Dilair C.; Martins, Luzilma T. F; Zanella, Rosemeire C; *et al.* Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 1998. Vol.2. Nº3, p: 160-163.
- DALLA COSTA, Libera; Reynolds P.E., Souza H; Souza D.C; Papelou M.F.I, Woodford N. Characterization of a divergent *vanD*-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000. Vol 44, Nº 3, p. 444-6.

- DEPARDIEU F., Podglajen I., Leclercq R., Collatz E., Courvalin P. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clinical Microbiology Review*. 2007. Vol. 20. N°. 1, p. 79-114.
- DIAZ PEREZ, Marilyn; RODRIGUEZ M., Claudio y ZHURBENKO, Raisa. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Rev. Cubana Hig Epidemiol* [online]. 2010, vol.48, n.2 [citado 2014-02-13], pp. 147-161. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032010000200006&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032010000200006&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1561-3003>
- DOMINGO M-C., Huletsky A., Giroux R., Boissinot, Picard F.J., Lebel P., Ferraro M.J. y Bergeron M.G. High Prevalence of Glycopeptide Resistance Genes *vanB*, *vanD*, and *vanG* Not Associated with Enterococci in Human Fecal Flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005. Vol. 49, N°. 11, p. 4784-4786.
- DOMINGO, Marc-Christian. *Caractérisation des gènes de résistance aux glycopeptides chez les bactéries de la flore intestinale autres que les entérocoques*. 2007. Tesis Doctoral. Université Laval.
- DUNNY, Gary M.; LEONARD, B. A.; HEDBERG, Peter J. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *Journal of bacteriology*, 1995, vol. 177, no 4, p. 871.
- DUTKA M.S., Evens S., Couvarlin P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995. Vol 33, N°1, p: 24-27.
- ECHEVARRÍA-ZÁRATE Juan, SARMIENTO E. y OSORES-PLENGE F. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Médica Peruana*. 2006, vol 23, n°1, p: 26-31.
- ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2005 – 2014. *SURVEILLANCE REPORT Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012*. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

(EARS-Net), p. 63- 67. ISBN 978-92-9193-511-6. disponible en <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>.

- FALAGAS, M. E., M. E., Makris, G. C., Dimopoulos, G., & Matthaiou, D. K. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance?. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, vol. 14, no 2, p. 101-104.
- FERNÁNDEZ F.J., De La Fuente J., Rubianes González M., Pérez Fernández S., Alvarez Fernandez M., Nodar Germiñas A., Sopeña Pérez-Argüelles y Martinez Vazquez C. Bacteremia por *Enterococcus faecalis*. *Revista Clínica Española*. 2004. Nº 204, Vol. 5, p. 244-250.
- FISHER, Katie; PHILLIPS, Carol. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 2009, vol. 155, no 6, p. 1749-1757.
- FLORES P., W. H. Características clínico-epidemiológicas de 14 casos con aislamiento clínico de enterococo resistente a Vancomicina en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. *Revista Médica Herediana*. 2007. Vol 18, Nº2, p.68-75. ISSN 1018-130X.
- FLORES P, W. H., Illescas Mucha R., Rodríguez Piazze L., Hidalgo Vidal J., Paz Rojas E., Mendivil Tuchia S. Reporte de datos acumulados de susceptibilidad antimicrobiana. Periodo 1 Enero 2009 – 30 Junio 2010 (1.5 años). 2009. Servicio de Microbiología. Departamento de Patología Clínica. Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen-ESSALUD.
- FLORES P., W. H. Epidemiología de la colonización intestinal con enterococo resistente a Vancomicina en pacientes de alto riesgo del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*. 2010, Vol. 21, Nº.3, p.128-139. ISSN 1018-130X.
- FLÓREZ J. *Farmacología humana*. 4ta ed. Barcelona: Masson S.A., 2003, p. 1141 – 1145. ISBN 84-458-1290-4.
- GARZA V., R., Hernández A. K. y Mejía Ch. A. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *Laborat acta*. 2002. Vol 14, Nº1, p: 11-20.

- GIRÓN G., J.A., Pérez Cano R. Tratamiento de las infecciones por enterococo. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz. *Revista Clínica Española* 2003. Vol 203, Nº10, p: 482-485.
- INS. Manual de Procedimientos para la prueba de Sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas Nº30. Ministerio de Salud Perú. Lima Perú. 2002.
- INS. Informe de la Resistencia Antimicrobiana En Hospitales En Perú (POI). Instituto Nacional de Salud. Lima Perú. 2007.
- JACOB E. Alan, Hobbs J. Susan. Conjugal Transfer of Plasmid-Borne Multiple Antibiotic Resistance in *Streptococcus faecalis* var. *Zymogenes*. *Journal of Bacteriology*. 1974, Vol 117, No. 2, p. 360-372.
- KAJIURA Takumi, Wada, H., Ito, K., Anzai, Y., & Kato, F. Conjugative plasmid transfer in the biofilm formed by *Enterococcus faecalis*. *Journal Of Health Science-Tokyo-*, 2006, vol. 52, no 4, p. 358.
- KEYHANI, Jacqueline, Keyhani, E., Attar, F., & Haddadi, A. Sensitivity to detergents and plasmid curing in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 33, no 3, p. 238-242.
- KLARE I., Konstabel C., Badstubner D., Werner G., Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*. 2003. Vol 88, p:269–290.
- KONEMAN E., Allen Stephen. Diagnostico microbiológico: texto y atlas en color. 2008. 6º edición. Editorial Médica Panamericana. p. 668-670.
- LATA P, Ram S, Agrawal M, Shanker R. 2009. Enterococci in river Ganga surface waters: propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. *BMC microbiology*. 9:140.



- LIGOZZI, Marco; CASCIO, Giuliana Lo; FONTANA, Roberta. *vanA* gene cluster in a vancomycin-resistant clinical isolate of *Bacillus circulans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1998, vol. 42, no 8, p. 2055-2059.
- LU, J. J., *et al.* Detection and typing of Vancomycin-resistance genes of enterococci from clinical and nosocomial surveillance specimens by multiplex PCR. *Epidemiology and infection*, 2001, vol. 126, no 3, p. 357-363.
- MARTÍNEZ-ODRIOZOLA, Pedro, *et al.* Análisis de 182 episodios de bacteriemia por enterococo: estudio de la epidemiología, microbiología y evolución clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2007, vol. 25, no 8, p. 503-507.
- MATER D.G., Langella P., Corthier G., & Flores M.J. Evidence of Vancomycin resistente gene transfer between enterococci of human origin in the gut of mice harbouring human microbiota. *Journal of Antimicrobial of Chemoterapy*. 2005. Vol 56, p. 975-978.
- MEDIAVILLA, A. Antibióticos aminoglucósidos y glucopéptidos. Farmacología humana. 3ª ed. Masson SA Barcelona, 1997, p. 1107-1121.
- MENDEZ-ÁLVAREZ, Sebastián; Perez-Hernández X., Claverie-Martín F. Glycopeptide resistance in enterococci. *International Microbiologyc*. 2000. Vol. 3, p. 71 – 80.
- MIGUENZ M., Bellucci S, Betti P., Torselli M., Frutos E., Staneloni M., *et al.* Evaluación del uso de Vancomicina en pacientes adultos. *Revista de la Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos*. 2004. Vol 14, Nº 3, p. 22 – 28.
- MOROSINI, María Isabel; CANTÓN, Rafael. Tolerancia y heterorresistencia en microorganismos grampositivos. *Medicina Clínica*, 2010, vol. 135, p. 16-22.
- MORRISON D., Woodford N., Cookson B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology Symposium Suplement*. 1997 Nº 83, p. 89-99.

- MSP. Guías de Prevención y Control de Enterococo Resistente a Vancomicina. Fondo Nacional de Recursos Uruguay. 2005.
- MURRAY B. The Life and Times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1990. Vol. 3 N° 1.p. 46-65.
- PANGALLO, Domenico, et al. Molecular investigation of enterococci isolated from different environmental sources. *Biologia*, 2004, vol. 59, no 6, p. 829-837.
- PAOLETTI, Claudia., Foglia, G., Princivalli, M. S., Magi, G., Guaglianone, E., Donelli, G. *et al.* Co-transfer of vanA and aggregation substance genes from *Enterococcus faecalis* isolates in intra-and interspecies matings. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2007, vol. 59, no 5, p. 1005-1009.
- PAZ Rojas, Enrique Luis; De Leon Pandolfi, Darío Ponce y Ramirez Ponce, Rafael. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta médica peruana* [online]. 2008, vol.25, n.3, pp. 140-147. Disponible en: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1728-59172008000300004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172008000300004&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1728-5917.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ, Carmen Xiomara. Caracterización molecular de los genotipos de resistencia a glucopéptidos en enterococos de los hospitales de Canarias. Asesores: Félix Claverie Martín y Antonio Burgos Ojeda. Tesis Doctoral. Universidad La Laguna, Facultad de Medicina. España, 2002.
- PEROZO MENA, Armino José, Gonzalez M.J., Ginestre M., Rincón G. Resistencia a Vancomicina en Cepas de *Enterococcus faecium* Aisladas en un Hospital Universitario. *Revista Kasmera*, 2011, vol. 39, no 1.
- PESET V., Tallon P, Sola C., Sánchez E., Sarrión A., Pérez-Belles C., Vindel A., Cantón E., *et al.* Epidemiological, microbiological, clinical, and prognostic factors of bacteremia caused by high-level Vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2000. N° 19, p. 742-749.

- QUIÑONES, P. A. *Enterococcus* aislados en Cuba: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética. 2011. Tesis Doctoral. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".
- RAMOS B., Diez-Ferrero P., Garcia-Hierro P., Flores M. & Sanchez Concheiro. 2004. CMI de *Enterococos* "Resistentes a Vancomicina" en el medio de cribado BHI- Vancomicina. En: XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). España 2004. Nº22, suplemento 1, p: 1- 230.
- REVILLA CUESTA Natalia. Análisis Farmacocinético-Farmacodinámico de Vancomicina en Pacientes de UCI. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, Facultad de Farmacia. España 2009.
- SACRAMENTO, Andrey Guimarães. *Tipagem molecular de cepas de Enterococcus spp resistentes à Vancomicina, isoladas em hospitais da cidade de São Paulo, no período de 1999 a 2008; Molecular typing of strains of Vancomycin-resistant Enterococcus spp isolated in hospitals in the São Paulo city during the years 1999 to 2008*. 2010. Tesis Doctoral. São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Programa de Pós-Graduação em Ciências.
- SAKOULAS, George; MOELLERING, Robert C. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, vol. 46, no Supplement 5, p. S360-S367.
- SALAS-VARGAS, Ana V., et al. Prevalencia e identificación genotípica de *Enterococos* Vancomicina resistentes en pacientes en un medio hospitalario. *Acta Médica Costarricense*, 2004, vol. 46, no 1, p. 19-26.
- SANTOS-BENEIT, Fernando; MARTÍN, Juan F.; BARREIRO, Carlos. Glycopeptides and Bacterial Cell Walls. En VILLA Tomás G. and VEIGA-CRESPO Patricia. *Antimicrobial Compounds*. Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 285-311.
- SCHULZ JOHN E., Sahm Daniel F. Reliability of the E Test for Detection of Ampicillin, Vancomycin, and High-Level Aminoglycoside Resistance in

*Enterococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. Vol. 31, N°. 12, p. 3336-3339.

- SHEPARD B., Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: The mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. 2002. *Microbes and Infection A Journal on Infectious Agents and Host Defenses*. Vol 4, p:215-224.
- SILVA RUIVO, Marta Isabel. “Estudo da disseminação de *Enterococcus faecalis* *vanA*+ em diferentes ambientes”. Asesores: Dra. María Fátima Silva Lopes, Dr. Mário Ramirez. Tesis para optar el grado de Maestría en Microbiología Clínica. Universidad de Lisboa. Facultad de Medicina de Lisboa. Lisboa - Portugal 2008.
- SLETVOLD, H., Johnsen, P. J., Wikmark, O. G., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., & Nielsen, K. M. *Tn1546* is part of a larger plasmid-encoded genetic unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2010, vol. 65, no 9, p. 1894-1906.
- SRINIVASAN, Arjun; DICK, James D.; PERL, Trish M. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 2002, vol. 15, no 3, p. 430-438.
- STINEAR T.P. PhD, PhD Olden Dianne., Johnson P.DR. PhD., PhD. Davies John K., MD. Grayson M. Lindsay. 2001. Enterococcal *vanB* resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *The Lancet*. Vol. 357, Issue 9259. P: 357:855-856.
- SUJATHA S., PRAHARAJ I. Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. *Interdisciplinary Perspective on Infectious Diseases*. 2012. Article ID. 781679, p. 10.
- SUMI Ada; Alvarado Débora; Jaramillo Michael; García-De La Guarda Ruth; Ramírez Pablo. Susceptibilidad antimicrobiana de especies de *Enterococcus* spp. aisladas del litoral marino de Lima”. Res. XVI Congreso Nacional de Biología y X Simposium Nacional de Educación en Ciencias Biológicas. Piura-Perú. 2006.

- SUMI JAUREGUI Ada. "Transferencia de plásmidos con resistencia a antibióticos en especies de *Enterococcus* provenientes del Mar de Lima". Asesora: Débora Alvarado Iparraguirre. Tesis título Profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima 2008, Perú.
- TERREROS PULLES, María Elena. "Técnicas moleculares en el estudio de infecciones hospitalarias: implementación de un sistema PCR múltiplex para detección de genes *vanA*, *vanB* y *vanC* de resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*". Asesores: Dr. Marcelo Grijalva, Patricia Jiménez. Tesis Título Profesional. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de ciencias de la vida Ingeniería en biotecnología. Ecuador 2009.
- TERREROS María., Grijalva M., Jiménez P. Implementación de un ensayo PCR Multiplex para detección de genes *vanA*, *vanB* y *vanC* relacionados con resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. Revista Ciencia 2010. Vol. 13, Nº 2, p. 141-150.
- TOMITA, Haruyoshi, Tanimoto, K., Hayakawa, S., Morinaga, K., Ezaki, K., Oshima, H., & Ike, Y. Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Journal of bacteriology, 2003, vol. 185, no 23, p. 7024-7028.
- TORRES Eva, Pérez Sonia, Vindel Ana, Rodríguez-Baño Jesús, Camba Vanesa, Villanueva Teresa M., Bou Germán. *Enterococcus faecium* resistente a glucopéptidos en un hospital del norte de España. Caracterización molecular y epidemiológica clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Vol. 27, Nº 9 pp:511-517. España 2008.
- VELÁSQUEZ Jorge, Lizaraso Frank, Zetola Nicola, Pamno Oscar, Sánchez Luis, Wong Walter, Hernández Rosa. Vigilancia de la resistencia de *Enterococcus* sp. a la vigilancia y evaluación in vitro de nuevas alternativas terapéuticas. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. Vol. 15, Nº 2. Lima - Perú 2002.
- WARDAL, Ewa; Sadowy, E., & Hryniewicz, W. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. Polish J Microbiol, 2010, vol. 597987.

- WOOD, Brian J. and Holzapfel, Wilhelm H. The Lactic Acid Bacteria: The general of lactic acid bacteria. Vol 2. Black Academic & Professional 1995. p. 327.
- WOOTTON, M., et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, vol. 47, no 4, p. 399-403.